



ALEXANDRE AUGUSTO MORAES DE SOUZA

**ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E MODELAGEM MOLECULAR DA *Croton pullei*
var. *glabrior* LANJ.**

BELÉM, PA - BRASIL

ABRIL DE 2021



**ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E MODELAGEM MOLECULAR DA *Croton pullei*
var. *glabrior* LANJ.**

ALEXANDRE AUGUSTO MORAES DE SOUZA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química acadêmico, PPGEQ/ITEC, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
Coorientador: Prof. Dr. Renato Araújo da Costa

BELÉM, PA - BRASIL
ABRIL DE 2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

- M827 Moraes de Souza, Alexandre Augusto.
Estudo de quantificação de compostos fenólicos, avaliação de atividades antioxidantes e modelagem molecular da *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. / Alexandre Augusto Moraes de Souza. — 2021. cxli, 141 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
Coorientador(a): Prof. Dr. Renato Araújo da Costa
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, Belém, 2021.

1. *Croton pullei* VAR. *glabrior* LANJ. 2. Extração. 3.
RMN. I. Título.

CDD 620

**ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS,
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANÁLISE TEÓRICA DA
Croton pullei var. *Glabrior* LANJ.**

Alexandre Augusto Moraes de Souza

Membros da Banca Examinadora para a Avaliação de defesa de dissertação de Mestrado do candidato *Alexandre Augusto Moraes de Souza* junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará

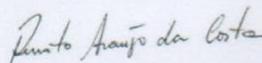
DATA DA AVALIAÇÃO: 16/04/2021

RESULTADO: Aprovado

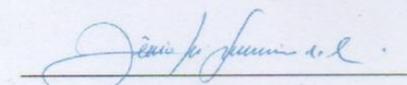
Examinada por:



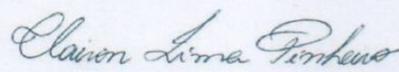
Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
(PPGEQ/ITEC/UFPA – Orientador)



Prof. Dr. Renato Araújo da Costa
(PPGEQ/ITEC/UFPA – Coorientador)



Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria
(PPGEQ/ITEC/UFPA – Membro Interno)



Prof. Dr. Clairon Lima Pinheiro
(EQ/EST/UEA – Membro Externo)

AGRADECIMENTOS

Ao **Deus Pai** por me acompanhar nessa jornada e nunca desistir de mim.

Aos meus pais **Keila da Conceição Moraes** (*in memorian*) e **Aldenor Fonseca de Souza** (*in memorian*) pela vida.

Aos meus avós, **Lucila Maria da Conceição Moraes** (*in memorian*) e **Benedito Ribeiro de Moraes** (*in memorian*). Obrigado por tudo.

Aos meus pais do coração **Conceição do Socorro Alves Souza** e **Cleodir da Conceição Moraes**. Pela ajuda nesta caminhada. Vocês foram fundamentais por mais essa conquista. Obrigado pela determinação em minha criação e mais importante por nunca terem desistido de mim. Sempre serei grato a vocês.

Aos Souzas **Antônio Souza, Danilo Furriel e Silvio Souza**. Aos Matos **Patrícia Kelly Arilson Oliveira, Lucas Oliveira, Daniel Oliveira**. A **Diane Moraes, Luma Moraes, Maisa Moraes, Selma Cristina, Cláudio Moraes e Polly**. Espero que a turbulência acabe para podermos voar em um céu límpido. Obrigado pelo apoio.

À pessoa que mudou minha vida. Admiro sua trajetória e és merecedora de tudo que tem acontecido em sua vida. És inteligente, gentil, prestativa, humilde. Agradeço por você ter permitido ser seu parceiro de vida. Te amo **Sônia Maria de Freitas Almeida**.

À CAPES, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À **Ferdinando, Cintya Cordovil Rodrigues, Elza Brandão Santana, Rafaela Oliveira Pinheiro e Samara de Paula Pinheiro Menezes Marques e Fabiana Cristina de Araújo Nascimento** pela colaboração no trabalho.

Aos amigos **Nayara Silva, Mariano Henrique, Pamela Lima, Maiana Maia, Felipe Gomes, Patrick Cruz e Pamella Cristiny**.

Ao trio **Alefhe Bernard, Letícia Siqueira e Viviane Garcia**. Obrigado pelo companheirismo.

Aos amigos que do mestrado **Rafael Silva, Kelly de Sousa e Sanderlei Lima**.

Dedico este trabalho a minha avó Lucila Maria da conceição Moraes (*in memorian*). Obrigado pela confiança, pelos momentos vividos, pela alegria que sempre transmitias. Te amo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	21
3.1	CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE <i>Croton pullei</i>	21
3.2	A FAMÍLIA <i>EUPHORBIACEAE</i>	21
3.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Croton</i>	22
3.4	<i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i> LANJ.	24
3.5	EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	28
3.5.1	Extração sólido-líquido (extração com solvente)	28
3.5.2	Maceração	29
3.5.3	Percolação	29
3.5.4	Soxhlet	30
3.5.5	Extração por ultrasson	30
3.5.6	Extração por micro-ondas	30
3.5.7	Extração por fluido supercrítico	30
3.6	COMPOSTOS FENÓLICOS	31
3.7	PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTO	33
3.8	PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN (PBB)	35
3.9	ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	37
3.10	FUNÇÃO DESEJABILIDADE	39
3.11	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)	41
3.12	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	43
3.13	DOCAGEM MOLECULAR	44
3.14	MICROORGANISMOS	45
3.15	ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUTASE: <i>Candida albicans</i> (PDB ID: 1AI9)	47
3.16	ENZIMA tirosil-tRNA: <i>Staphylococcus aureus</i> (PDB ID: 1JIJ)	47
3.17	ENZIMA SIALIDASE: <i>Salmonella Thyphimurium</i> (PDB ID: 1DIM)	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	MATERIAL	49
4.1.1	Obtenção do material botânico	49
4.2	MÉTODOS	50
4.2.1	Determinação da Umidade residual	50
4.2.2	Análise Granulométrica	51
4.2.3	Caracterização do material botânico	52
4.2.4	Planejamento Experimental de Extração	53
4.2.4.1	Extração Convencional	53
4.2.4.2	Operação do equipamento	54
4.2.5	Cálculo do rendimento dos extratos (%)	56

4.3	QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	57
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	58
4.4.1	Preparo da solução de DPPH 0,06 mM utilizado na análise	59
4.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR TEÓRICA	59
4.6	DOCAGEM MOLECULAR	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS	62
5.1.1	Determinação da Umidade do <i>C. pullei</i>	62
5.1.2	Análise Granulométrica da casca do <i>C. pullei</i>	62
5.2	ESTUDOS FITOQUÍMICOS	63
5.2.1	Análise de Rendimento	63
5.2.1.2	Análise estatística da variável de resposta Rendimento (RD)	65
5.2.2	Quantificação de Polifenóis Totais	72
5.2.2.1	Análise estatística da variável de resposta Polifenóis Totais (PT)	73
5.2.3	Análise de Atividade Antioxidante	79
5.2.3.1	Análise estatística da variável antioxidante (AA)	81
5.2.4	Função Desejabilidade	87
5.3	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	90
5.4	DOCAGEM MOLECULAR	112
5.4.1	Cálculos de docagem molecular	112
6	CONCLUSÃO	125
7	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	126
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
9	APÊNDICE	141
9.1	Laudo de identificação botânica	141

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar, a partir de extratos, o rendimento (em base seca), quantificar os polifenóis totais, avaliar a atividade antioxidante, realizar uma pesquisa teórica de RMN das estruturas julocrotina, crotonimida A e crotonimida B, oriundas da *Croton pullei* VAR. *glabrior* LANJ. e avaliar essas moléculas na docagem molecular frente às enzimas *Candida albicans* (PDB ID: 1AI9), *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 1DIM) e *Salmonella thyphimurium* (PDB ID: 4URM). Realizou-se uma extração convencional utilizando um extrator de aço-inox e planejamento de três fatores (temperatura, granulometria e relação sólido/líquido) e três níveis Box-Behnken, para determinar quais variáveis foram influentes nas respostas. A quantificação de polifenóis totais foi realizada de acordo com a metodologia de Folin-Ciocalteu. Para a análise antioxidante aplicou-se o método IC₅₀. E o estudo teórico de RMN foi realizado via DFT, onde os métodos computacionais DFT/B3LYP/cc-pvDZ e DFT/B3LYP/6-31 G* foram aplicados para a obtenção dos deslocamentos químicos (δ H e δ C), para comparar aos experimentais e assim fornecer qual método computacional é o mais eficiente. Os rendimentos variam entre 5,57 e 10,61. Na quantificação polifenóis totais houve variação entre 101,33 e 308,84 mg EAG/g. Os valores antioxidantes mínimo e máximo foram 94,74% e 98,97%. De modo geral a metodologia DFT/B3LYP/cc-pvDZ fora mais eficiente frente as estruturas analisadas. As moléculas apresentaram ligações de hidrogênio com resíduos Lys 57(A), Arg 56(A), Cys37, Gly38, Asp62, Gly193, Tyr342, Gly56, Arg37, Tyr128, Arg56, Thr58(A), Gly114(A) e Thr 127.

Palavras-chave: *Croton pullei* VAR. *glabrior* LANJ; Extração; RMN.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate, from extracts, the yield (on a dry basis), quantify the total polyphenols, evaluate the antioxidant activity, perform a theoretical NMR research of the julocrotine, crotonimide A and crotonimide B structures, from *Croton pullei* VAR. *glabrior* LANJ. and evaluate these molecules in molecular docking against the enzymes *Candida albicans* (PDB ID: 1AI9), *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 1DIM) and *Salmonella thyphimurium* (PDB ID: 4URM). A conventional extraction was performed using a stainless-steel extractor and three-factor planning (temperature, particle size and solid/liquid ratio) and three Box-Behnken levels, to determine which variables were influential in the responses. The quantification of total polyphenols was performed according to the Folin-Ciocalteu methodology. For the antioxidant analysis, the IC₅₀ method was applied. And the theoretical NMR study was carried out via DFT, where the computational methods DFT/B3LYP/cc-pvDZ and DFT/B3LYP/6-31 G* were applied to obtain the chemical displacements (δH and δC), to compare to the experimental ones and thus provide which computational method is the most efficient. Yields vary between 5.57 and 10.61. In the quantification of total polyphenols, there was a variation between 101.33 and 308.84 mg EAG/g. The minimum and maximum antioxidant values were 94.74% and 98.97%. In general, the DFT/B3LYP/cc-pvDZ methodology was more efficient compared to the analyzed structures. The molecules showed hydrogen bonds with residues Lys 57 (A), Arg 56 (A), Cys37, Gly38, Asp62, Gly193, Tyr342, Gly56, Arg37, Tyr128, Arg56, Thr58 (A), Gly114 (A) and Thr 127.

Keywords: *Croton pullei* VAR. *glabrior* LANJ; Extraction; NMR.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

6-31 G	2 funções de base, uma com 3 funções primitivas e uma com 1 função primitiva
%	Porcentagem
Σ	Somatório
p.	Página
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
AA	Atividade Antioxidante
AAA	Triterpeno ácido acetilaleurítico
ABTS	Sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)
B3LYP	Becky3, Lee Yang e Parr
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
cm	Centímetro
DFT	Density Functional Theory
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EAG	Equivalente Ácido Gálico
EAM	Erro absoluto médio
EAMC	Erro absoluto médio corrigido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	Gramas
G	Granulometria
h	hora
H ⁺	Íon hidrogênio
Hz	Hertz
IV	Espectroscopia no Infravermelho
K ⁺	Íon potássio
KBr	Brometo de potássio
Kg	Kilograma
L	Litro
m/s	Relação massa/solvente

mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mm	Milimolar
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
MTT	Sal de tetrazólio
NaCO ₃	Carbonato de Sódio
Nm	Nanômetro
P. A.	Puro para análise
pH	Potencial de Hidrogênio
R ²	Coefficiente de Determinação
Rd	Rendimento
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SA	Sem Atividade
t	Tempo
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
vis.	Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Distribuição geográfica de <i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i> LANJ (●).	25
Figura 02. <i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i> LANJ. (A) Ramo com inflorescência bissexuada; (B) Flor estaminada; (C) Flor pistilada com cálice assimétrico, reduplicado; (D) Ovário	26
Figura 03. Estrutura química da julocrotina	27
Figura 04. Estruturas químicas das cotonimidias (A) A e (B) B	27
Figura 05. Exemplos de flavonóides comumente encontrados: (A) catequinas e (B) antocianinas	32
Figura 06. Algumas estruturas do tipo não-flavonoides: (A) ácidos hidroxilbenzóico e do (B) hidroxicinâmico	33
Figura 07. Modelo geral de processo	34
Figura 08. Processo antioxidativo (A) reação para capturar o DPPH e (B) alteração de coloração.	43
Figura 09. Local de coleta da planta <i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i> LANJ. (Coordenadas 1°06'04.6"S 47°19'43.7"W)	49
Figura 10. Material coletado	49
Figura 11. Moinho de facas	50
Figura 12. Analisador de umidade por infravermelho	51
Figura 13. Equipamento ROTAP em funcionamento	52
Figura 14. Exsicata preparada para identificação de sua espécie	52
Figura 15. Sistema para extração	55
Figura 16. Evaporador rotativo em funcionamento	56
Figura 17. Extratos obtidos da extração (A) com tampa e (B) sem tampa	56
Figura 18. Soluções para construção da curva analítica	57
Figura 19. Curva analítica para o teste de quantificação de compostos fenólicos	58
Figura 20. Gráfico da Distribuição Granulométrica da casca do caule do <i>C. pullei</i> VAR	63
Figura 21. Gráfico de pareto para a resposta Rendimento	68
Figura 22. Gráfico da Distribuição dos resíduos para o Rendimento	70
Figura 23. Gráfico do Teste de Normalidade para Rendimento	70
Figura 24. (A) Gráfico da Superfície de Resposta e (B) Curva de Nível para rendimento	71
Figura 25. Gráfico de pareto para a resposta Polifenóis Totais	76
Figura 26. Gráfico da Distribuição dos resíduos para Polifenóis Totais	77

Figura 27. Gráfico do Teste de Normalidade para Polifenóis Totais	78
Figura 28. (A) Gráfico da Superfície de Resposta e (B) Curva de Nível para Polifenóis Totais	79
Figura 29. Gráfico de Pareto para a resposta Atividade Antioxidante	83
Figura 30. Gráfico da Distribuição dos resíduos para Atividade Antioxidante	84
Figura 31. Gráfico do Teste de Normalidade para Atividade Antioxidante	85
Figura 32. (A) Gráfico da Superfície de Resposta e (B) Curva de Nível para Atividade Antioxidante	86
Figura 33. Perfis de função desejabilidade para as respostas Rendimento, Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante	88
Figura 34. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da julocrotina com método B3LYP/6-31 G	93
Figura 35. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da julocrotina com método B3LYP/cc-pvDZ	94
Figura 36. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da julocrotina com método B3LYP/6-31 G	94
Figura 37. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da julocrotina com método B3LYP/cc-pvDZ	95
Figura 38. Gráfico 1H com método B3LYP/cc-pVDZ para a julocrotina	96
Figura 39. Gráfico 1H com método B3LYP/6-31 G para a julocrotina	96
Figura 40. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/cc-pVDZ para a julocrotina	96
Figura 41. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/6-31 G para a julocrotina	97
Figura 42. Gráfico 1H com método B3LYP/cc-pVDZ para a crotonimida A	98
Figura 43. Gráfico 1H com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida A	98
Figura 44. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/cc-pVDZ para a crotonimida A	98
Figura 45. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida A	99
Figura 46. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida A com método B3LYP/6-31 G	102
Figura 47. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida A com método B3LYP/cc-pvDZ	102
Figura 48. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da crotonimida A com método B3LYP/6-31 G	103

Figura 49. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C ¹³ da crotonimida A com método B3LYP/cc-pvDZ	103
Figura 50. Gráfico ¹ H com método B3LYP/cc- pVDZ para a crotonimida B	104
Figura 51. Gráfico ¹ H com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida B	105
Figura 52. Gráfico ¹³ C com método B3LYP/cc-pVDZ para a crotonimida B	105
Figura 53. Gráfico ¹³ C com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida B	105
Figura 54. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H ¹ da crotonimida B com método B3LYP/6-31 G	108
Figura 55. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H ¹ da crotonimida B com método B3LYP/cc-pvDZ	108
Figura 56. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C ¹³ da crotonimida B com método B3LYP/6-31 G	109
Figura 57. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C ¹³ da crotonimida B com método B3LYP/cc-pvDZ	109
Figura 58. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Lys 57(A) e Arg 56(A) da enzima <i>Candida albicans</i> (2D)	113
Figura 59. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Lys 57(A) e Arg 56(A) da enzima <i>Candida albicans</i> (3D)	114
Figura 60. Ligações de resíduos em sítios ativos da enzima <i>Candida albicans</i>	114
Figura 61. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Gly38 e Cys37 da enzima <i>Staphylococcus aureus</i> (2D)	115
Figura 62. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Gly38 e Cys37 da enzima <i>Staphylococcus aureus</i> (3D)	115
Figura 63. Ligações de resíduos em sítios ativos da enzima <i>Staphylococcus aureus</i>	116
Figura 64. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduo de aminoácido Asp62 da <i>Salmonella thyphimurium</i> (2D)	117
Figura 65. Interações entre a estrutura crotonimida A e o resíduo de aminoácido Asp62 da <i>Salmonella thyphimurium</i> (3D)	117
Figura 66. Ligações de resíduos em sítios ativos da enzima <i>Salmonella thyphimurium</i>	118
Figura 67. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduo Lys57(A) da <i>Candida albicans</i> (2D)	119
Figura 68. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduo Lys57(A) da <i>Candida albicans</i> (3D)	119

Figura 69. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduo de aminoácido Gly193 da <i>Staphylococcus aureus</i> (2D)	120
Figura 70. Interações entre a estrutura crotonimida B e o resíduo de aminoácido Gly193 da <i>Staphylococcus aureus</i> (3D)	120
Figura 71. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduos de Trp128 e Arg56 da <i>Salmonella thyphimurium</i> (2D)	121
Figura 72. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduos de Trp128 e Arg56 da <i>Salmonella thyphimurium</i> (2D)	121
Figura 73. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Thr58(A) e Gly114(A) da <i>Candida albicans</i> (2D)	122
Figura 74. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Thr58(A) e Gly114(A) da <i>Candida albicans</i> (3D)	122
Figura 75. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Gly193 e Cys37 da <i>Staphylococcus aureus</i> (2D)	123
Figura 76. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Gly193 e Cys37 da <i>Staphylococcus aureus</i> (3D)	123
Figura 77. Interações entre a estrutura julocrotina e o resíduo de aminoácido Thr127 da <i>Salmonella thyphimurium</i> (2D)	124
Figura 78. Interações entre a estrutura julocrotina e o resíduo de aminoácido Thr127 da <i>Salmonella thyphimurium</i> (3D)	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Algumas espécies do gênero <i>Croton</i> ocorrentes no Brasil	23
Tabela 02. Classes e estruturas químicas dos compostos fenólicos	32
Tabela 03. Matriz de planejamento de Box-Behnken em ordem padronizada	36
Tabela 04. Comparação da eficiência dos planejamentos PBB e PCC	37
Tabela 05. Estimativas padrão para escala de desejabilidade	41
Tabela 06. Variáveis de entrada e seus respectivos níveis	53
Tabela 07. Matriz do Planejamento da Extração Convencional	54
Tabela 08. Dados utilizados para os cálculos do Diâmetro médio de Sauter	62
Tabela 09. Matriz experimental para a variável de resposta Rendimento	65
Tabela 10. Efeitos Estimados para Rendimento	66
Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Rendimento	67
Tabela 12. Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rendimento	69
Tabela 13. Matriz experimental para a variável de resposta Polifenóis Totais	73
Tabela 14. Efeitos Estimados para Polifenóis Totais	74
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Polifenóis Totais	75
Tabela 16. Coeficientes de regressão para a variável de resposta Polifenóis Totais	77
Tabela 17. Matriz experimental para a variável de resposta Atividade Antioxidante	80
Tabela 18. Efeitos Estimados para Atividade Antioxidante	81
Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Atividade Antioxidante	82
Tabela 20. Coeficientes de regressão para a variável de resposta Atividade Antioxidante	84
Tabela 21. Parâmetros utilizados na otimização das respostas Rendimento, Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante	87
Tabela 22. Respostas Rendimento, Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante dos extratos obtidos	89
Tabela 23. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ¹ H RMN (ppm) da julocrotina	91
Tabela 24. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ¹³ C RMN (ppm) da julocrotina	92
Tabela 25. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ¹ H RMN (ppm) da crotonimida A	100
Tabela 26. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ¹³ C RMN (ppm) da crotonimida A	101

Tabela 27. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^1H RMN (ppm) da crotonimida B	106
Tabela 28. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^{13}C RMN (ppm) da crotonimida B	107
Tabela 29. Correlações e parâmetros de ajuste linear para as bandas de absorção de RMN para δH calculado em clorofórmio para julocrotina, crotonimida A e crotonimida B	110
Tabela 30. Correlações e parâmetros de ajuste linear para as bandas de absorção de RMN para δC calculado em clorofórmio para julocrotina, crotonimida A e crotonimida B	111
Tabela 31. Lista dos compostos e seus respectivos valores de energias de docagem, preditas pelos programas Molegro Virtual Dock (PDB ID: 1AI9)	112
Tabela 32. Lista dos compostos e seus respectivos valores de energias de docagem, preditas pelos programas Molegro Virtual Dock (PDB ID: 1JIJ)	112
Tabela 33. Lista dos compostos e seus respectivos valores de energias de docagem, preditas pelos programas Molegro Virtual Dock (PDB ID: 1DIM)	113

1 INTRODUÇÃO

As práticas complementares de cuidado à saúde são tão antigas quanto o surgimento da espécie humana, uma vez que desde o início da civilização fazem parte do cuidado familiar. Dentre essas práticas difundidas pela cultura popular, as plantas sempre ganhavam destaque, e por muito tempo foram o principal recurso empregado no tratamento da saúde das pessoas (BADKE et al., 2012).

A utilização de plantas como medicamento está fundamentada em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas de alguns vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SCOPEL, 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1979), plantas medicinais são “todas as plantas que apresentam, em um ou mais, órgãos substâncias com potencial de finalidade terapêutica ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. Nessa perspectiva, toda planta que contém princípios ativos e são de extrema importância para a saúde humana, são denominadas plantas medicinais (MORGAN, 1994; RICARDO; 2011).

A definição de fitoterápico pela Secretaria de Vigilância Sanitária, ANVISA, em sua portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995 é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto acabado, embalado e rotulado”.

Estudos prévios em áreas do conhecimento como estudos de atividade biológica, desenvolvimento de metodologias analíticas, estudos botânicos, químicos e agrônomos são essenciais para o desenvolvimento tecnológico de um fitoterápico (NAVARRO, 2005).

Dentro do cenário mundial de fitoterápicos, o Brasil é o país que apresenta a maior diversidade do planeta, possuindo biomas díspares e uma flora diversificada. No país, cerca de 60.000 espécies vegetais superiores foram catalogadas, sendo muitas delas com uso medicinal popular, embora muitas não possuam estudos aprofundados de indicações

terapêuticas comprovadas, quanto à sua composição química e ações farmacológicas. Apesar de determinados estudos afirmarem que as plantas apresentam eficácia em terapêuticos, 8% retratam estudos de compostos bioativos e 1.100 espécies avaliadas com relação às propriedades medicinais, sendo que essas descrevem um importante potencial econômico (GUERRA; NODARI, 2001; RATES, 2001; PEREZ, 2004; GURIB-FAKIM, 2006).

A Amazônia exibe uma extensa variedade de espécies vegetais nativas e exóticas, entretanto, poucas espécies são analisadas e descritas em publicações científicas. Para isso deve-se considerar a elaboração de extratos obtidos a partir dos vegetais os quais são ricos em substâncias que apresentam potenciais como antioxidante e antimicrobiano. (BRAZ-FILHO, 1999; SILVA et al., 2005).

Os vegetais de caráter antioxidante são compostos que apresentam a capacidade de inibir ou bloquear processos oxidativos, quando em baixas concentrações. O equilíbrio da qualidade de alguns produtos é obtido através da adição de antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxi-tolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA), porém estas substâncias apresentam riscos à saúde humana. Portanto, a pesquisa por antioxidantes de fontes naturais que possam substituir os sintéticos tem recebido muita atenção por parte do segmento acadêmico e industrial (DECKER, 2008; MATKOWSKI, 2008; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008; BOTTERWECK et al., 2000; DAHANUKAR et al., 2000).

Outro fator a ser considerado é a ação antimicrobiana que combatem diversas patogenias nos seres humanos (RAUHA, 2000).

Logo, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a interferência de processos de extração para a obtenção de rendimento atividades antioxidante, quantificação de polifenóis totais e avaliar o comportamento antimicrobiano teórico das cascas do caule da *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa avaliar o rendimento, potenciais antioxidantes e antimicrobianos e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos da casca do caule do vegetal *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar o processo de extração sólido-líquido das cascas do caule de *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. utilizando álcool etílico como solvente, de acordo com planejamento experimental Box-Behnken;
- b) Analisar os rendimentos dos extratos;
- c) Quantificar os polifenóis totais dos extratos, utilizando o método de Folin-Ciocalteu;
- d) Estabelecer seu potencial antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila);
- e) Executar cálculos teóricos utilizando funcionais híbridos B3LYP conjugados com o conjunto de funções de bases cc-pVDZ e 6-31 G para obtenção de dados geométricos e de RMN das moléculas julocrotina, crotonimida A e crotonimida B;
- f) Comparar os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos teoricamente com os dados experimentais.
- g) Predizer as energias de afinidade e os modos de ligação entre as moléculas julocrotina, crotonimida A e crotonimida B e as enzimas *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella thyphimurium* através dos cálculos de docagem molecular.

3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

3.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Croton pullei*

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Malpighiales
- Família: Euphorbiaceae
- Subfamília: Crotonoideae
- Gênero: *Croton*
- Espécie: *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ.

3.2 A FAMÍLIA *EUPHORBIACEAE*

Euphorbiaceae é uma das famílias mais complexas e diversificadas da ordem *Malpighiales*, com aproximadamente 6300 espécies e 300 gêneros (APG III, 2012). Essa família, no Brasil, apresenta cerca de 63 gêneros e 918 espécies (CORDEIRO et al., 2014) distribuídos nos diferentes tipos de vegetações. São plantas de hábito variado, desde ervas, subarbustos, árvores, até trepadeiras, com folhas inteiras ou partidas, em geral com estípulas, latescentes ou não. (CORDEIRO, 1993; CORDEIRO et al., 2012; FERRAZ, 1996; HARLEY, 1995; PAIVA JR et al., 2000; SANTOS-FILHO et al., 2000).

As plantas pertencentes à família *Euphorbiaceae* são amplamente distribuídas por todo o mundo, sendo algumas espécies habitantes de regiões de clima tropical, que sobrevivem a condições de deserto, enquanto outras são árvores e ervas que habitam florestas. Trata-se de uma família bastante heterogênea do ponto de vista químico, fator que contribui também para a grande diversidade de atividades biológicas (MWINE; VAN DAMME, 2011; KOTHALE; ROTHE; PAWADE, 2011).

Dentre suas características botânicas, há a presença de substâncias latescentes, as quais são visíveis quando a planta é submetida a injúrias mecânicas. Plantas que pertencem à família *Euphorbiaceae*, vêm se destacando em termos de importância econômica, principalmente na alimentação humana, medicina popular e produção de látex e óleos (LUND; WEBSTER, 1967).

Algumas espécies são utilizadas na alimentação humana, principalmente na região nordeste do Brasil, como *Manihot esculenta* Crantz, da qual se extrai a farinha de mandioca (BRAGA, 1976; MACHADO, 2007). Outros representantes da família já movimentaram grandes riquezas no Brasil, especialmente pela extração de látex para a

produção de borracha natural, como as espécies dos gêneros *Hevea aublet* (seringueira), que fortaleceram economicamente a região amazônica ou espécies de *Manihot sp* Miller, que foram responsáveis por manter, durante algum tempo, a economia da região da caatinga nordestina. Além disso, as *Euphorbiaceae* destacam-se economicamente pela produção de óleos que apresentam diversos usos na indústria de tintas, plásticos, plastificantes, sabões duros, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons, cosméticos, papel, fertilizantes ou como lubrificante de motores de alta rotação e turbinas de aviões a jato, especialmente os extraídos de espécies do gênero *Ricinus* L. (BRAGA, 1976; MACHADO, 2007). A medicina popular também é contemplada com diversas espécies da família *Euphorbiaceae*: pelo uso do chá de efeito antilítico, diurético, anti-hepatóxico e antiespasmódico, extraído de espécies do gênero *Phyllanthus* ou o chá das raízes de efeito cicatrizante, tônico e diurético de espécies do gênero *Cnidocolus sp* Pohl ou de espécies do gênero *Euphorbia* L., utilizadas como antidiarréicas (BRAGA, 1976; MACHADO, 2007).

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Croton*

Croton L., com cerca de 1.300 espécies, é o segundo maior gênero da família *Euphorbiaceae* s.s, que vão de ervas a árvores de grande porte (Tabela 01) (BERRY et al., 2005; GOVAERTS et al., 2000; SILVA, 2016). Ocorre em abundância em todo o planeta, com concentração significativa na África, México e Brasil (MACIEL et al., 2013). Na América do Sul, o Brasil é o país que congrega o maior número de espécies, aproximadamente 350, onde podemos encontrar 62 espécies na caatinga (BERRY et al., 2005; CORDEIRO et al., 2014), podendo também ser encontradas na Amazônia, cerrado, e nos campos rupestres.

Essas espécies usualmente possuem folhas com dimensões que vão desde 5,0 a 12,0 cm de largura e 8,0 a 22,0 cm de comprimento, apresentando-se algumas vezes com pelos estrelados, as demais, pelos lepidotos ou escamosos (SOBRAL, 2006).

É considerado um gênero com uma composição química diversa. Isso faz com que este gênero seja considerado altamente promissor para estudo de substâncias naturais farmacologicamente ativas (TORRES et al., 2020; GUTIÉRREZ et al., 2010).

Tabela 01. Algumas espécies do gênero *Croton* ocorrentes no Brasil

<i>C. abegii</i> Urb. & Ekman <i>C. antisiphiliticus</i> Mart. <i>C. argyrophylloides</i> Muell Arg.	<i>C. inaequilobus</i> Steyererm	<i>C. piptocalyx</i> Mull. Arg. <i>C. priscus</i> Croizat <i>C. pullei</i> Lanjouw
<i>C. cajucara</i> Benth <i>C. caperoniifolius</i> Mull. Arg. <i>C. campestris</i> A. St <i>C. celtidifolius</i> Baillon <i>C. cordifolius</i> Baillon <i>C. crustulifer</i> Croizat <i>C. cuneatus</i> Klotz	<i>C. jacobinensis</i> Baillon <i>C. junceus</i> Baillon	<i>C. rhamnifolius</i> Kunth
<i>C. echioides</i> Baillon <i>C. essequiboensis</i> Klotzsch	<i>C. maracayuensis</i> Chodat & Hassler <i>C. matourensis</i> Aubl. <i>C. micans</i> Baillon <i>C. microgyne</i> Croizat <i>C. mucronifolius</i> Mull. Arg.	<i>C. sacaquinha</i> Benth <i>C. salutaris</i> Casar <i>C. sampatik</i> Mull. Arg. <i>C. sepotubensis</i> Hoehne <i>C. sincorensis</i> Mart. Ex Muell Arg. <i>C. sonderianus</i> Mull. Arg. <i>C. sphaerogynus</i> Baillon
<i>C. glechomifolius</i> Mull. Arg. <i>C. goyazensis</i> Mull. Arg. <i>C. gracilescens</i> Mull. Arg.	<i>C. nepetifolius</i> Baillon <i>C. nummularius</i> Baillon	<i>C. tessmannii</i> Mansf <i>C. tetradenius</i> Baillon
<i>C. hemiargyreus</i> Muell Arg. <i>C. heterocalyx</i> Baillon	<i>C. ocalia</i> Baillon <i>C. organensis</i> Baillon	<i>C. urucurama</i> Baill <i>C. zehntneri</i> Pax e Hoffm

Fonte. CORDEIRO et al., 2014

Os vegetais pertencentes ao gênero *Croton* apresentam aplicações medicinais para o tratamento de diversas patologias como: diabetes, colesterol alto, problemas gastrointestinais, leucemia, reumatismo, diarreia, anorexia, hepatite, obesidade e problemas respiratórios. São utilizadas diversas partes desta planta, destacando-se cascas, folhas, raízes e sementes (SALATINO et al., 2007).

Estudos utilizando espécies da família *Euphorbiaceae* revelaram a presença de diversos compostos de caráter químico biologicamente ativos, dentre eles destacam-se os terpenóides (BITTNER et al., 2001; SOUZA et al., 2005; HAESBAERT; LIMONAD

2007; RAJESH et al., 2006). Esses possuem esqueletos: cembranóides, clerodanos, neoclerodanos, halimanos, isopimaranos, cauranos, sarcopetalanos, labdanos, ésteres do forbol e traquilobanos (BLOCK et al. 2004).

Diversas espécies do gênero *Croton* apresentam funções químicas do tipo aromáticos em sua estrutura. Dentre elas, podemos destacar os óleos voláteis, que podem conter mono e sesquiterpenóides e, às vezes, compostos derivados do chiquimato (OLIVEIRA et al., 2001a; LOPES et al., 2003; SALATINO et al., 2007). O látex é uma substância que apresenta propriedades medicinais, podendo apresentar coloração avermelhada e conter pró-antocianidinas e/ou alcalóides (SANDOVAL et al., 2005; RISCO et al., 2003). Outros metabólitos frequentemente relatados são os triterpenos e compostos fenólicos, como flavonóides, lignóides e pró-antocianidinas (SALATINO et al., 2007; BARRETO et al., 2013).

3.4 *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ.

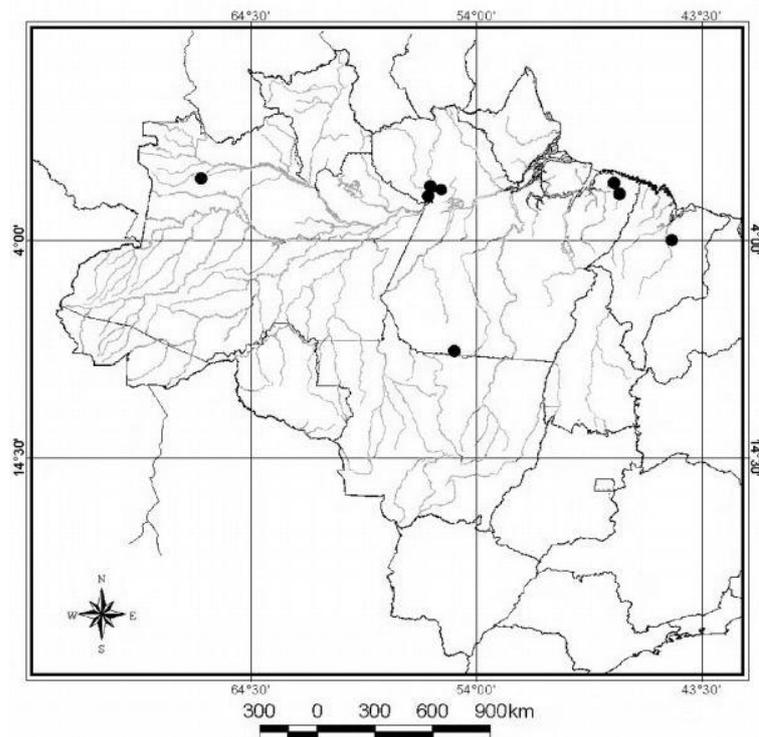
Croton pullei var. *glabrior* LANJ. (Euphorbiaceae) é uma liana que cresce acima de outras árvores e são distribuídas em áreas tropicais (GALLENMULLER et al., 2001). É popularmente conhecido como “sangue do dragão”, devido a presença de um líquido viscosos de coloração avermelhada em seu interior, o qual remete a sangue de animais. Ocorre no Brasil, apenas nos Estados do Pará, Maranhão e Roraima, sendo encontrado também na Guiana e Guiana Francesa (Figura 01) (GUIMARÃES, 2006).

Suas características são de folhas palminérveas cujo indumento é estrelado na face abaxial, constituída de estame de 10-100, flores pistiladas com pedicelos e sépalas reduplicadas (valvadas) e estiletos multífidos (GUIMARÃES, 2006).

Croton pullei destaca-se por ser uma liana com o cálice da flor pistilada com os lobos irregulares, assimétricos, reduplicados. Apresenta também uma rede de nervuras na qual se ramifica até a sexta grandeza e grande quantidade de drusas distribuídas por todo o limbo foliar (Figura 02) (GUIMARÃES, 2006).

A espécie *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. não desenvolve estruturas especializadas de escalada, tais como crescimento entrelaçado, ganchos, espinhos ou galinhas, porém espécimes maduros geralmente apresentam a aparência de cipós. Todavia, nenhum arranjo anômalo de tecidos secundários descrito para muitas outras espécies de lianas tropicais é encontrado em hastes de *C. pullei*. (CABALLÉ, 1998; FISHER; EWERS, 1996; SPECK et al., 1996).

Figura 01. Distribuição geográfica de *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ (●).

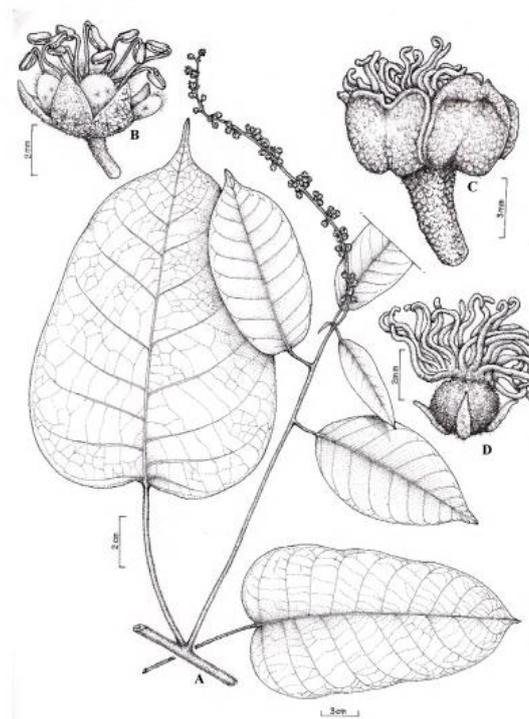


Fonte. GUIMARÃES, 2010.

Já espécimes mais jovens de *C. pullei* mostram uma diversidade de posições e orientações de crescimento e são independentes ou sustentadas pela vegetação circundante. Análises das propriedades mecânicas desta espécie tem de ser feita para fornecer informações adicionais sobre a diversidade de estratégias de crescimento entre formas de crescimento lianóides (SPECK et al., 1996).

As hastes de *Croton pullei* são orientadas verticalmente e não são fixadas ou suportadas pela vegetação circundante. Tornam-se, portanto, instáveis e chegam a um comprimento máximo de cerca de quatro metros. As hastes suportadas abrangem os principais eixos e galhos apoiados ou alojados entre as plantas hospedeiras (GALLENMULLER et al., 2001).

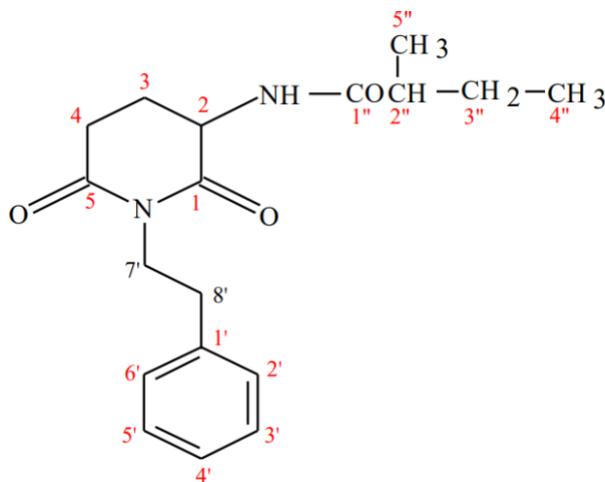
Figura 02. *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. (A) Ramo com inflorescência bissexuada; (B) Flor estaminada; (C) Flor pistilada com cálice assimétrico, reduplicado; (D) Ovário



Fonte. GUIMARÃES, 2010.

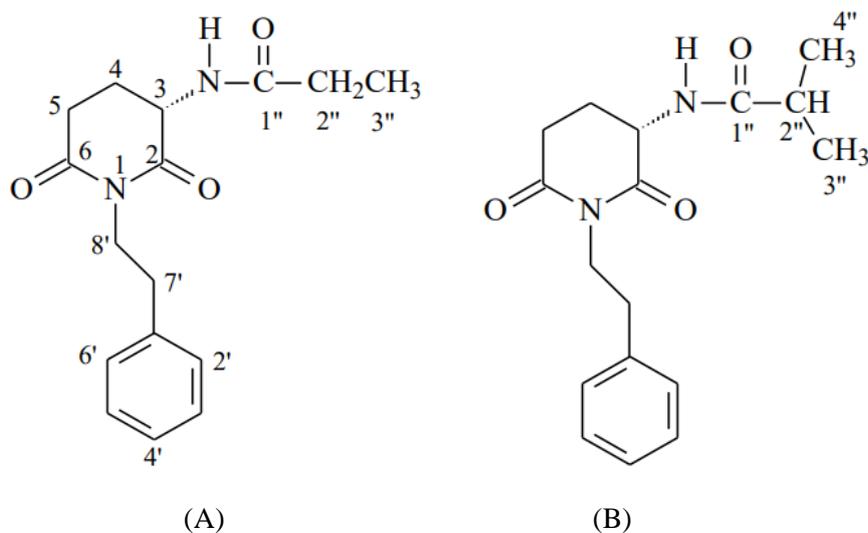
Croton pullei var. *glabrior* LANJ. contém alcalóides como a julocrotina (2-[N-(2-methylbutanolyl)]-N-phenylethylglutarimide) (Figura 03) e glutarimidas A e B (Figuras 04 A e B) (SECCO, 1992; GALLENMULLER et al., 2001; BARBOSA et al., 2007). Rocha et al. (2008) ao estudarem camundongos com extratos metanólicos de folhas de *Croton pullei* observaram que o extrato reduzia significativamente o número de contorções abdominais em camundongos, sugerindo uma atividade antinociceptiva da planta. Além disso, a mesma amostra inibiu um edema na orelha de um camundongo e reduziu a migração leucocitária no teste da peritonite induzida por carragenina, indicando uma atividade anti-inflamatória. De acordo com estes resultados, pode-se justificar o bom uso medicinal de *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. (Euphorbiaceae), contra patógenos que causam dor e inflamação (MSHANA et al., 2000).

Figura 03. Estrutura química da julocrotina



Fonte. ABREU et al., 2001

Figura 04. Estruturas químicas das cotonimidias (A) A e (B) B



Fonte. TRINDADE, 2010

Além das atividades mostradas anteriormente, hoje sabe-se que *Croton pullei* apresenta efeito hipoglicemiante, atividade antiespasmódica, atividade antiulcerogênica e antiproliferativa (FELIU, 2011; ROCHA et al., 2008).

3.5 EXTRAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

3.5.1 Extração sólido-líquido (extração com solvente)

A extração sólido-líquido é uma técnica comumente empregada para a obtenção de propriedades ativas de material botânico (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). É uma técnica tradicional, na qual consiste na submersão da planta em solvente durante certo período com agitação. A separação é realizada quimicamente, sendo o solvente posteriormente removido por evaporação (GALVÃO, 2004).

Entretanto, uma das dificuldades que se encontra ao utilizar essa técnica é a de ser praticamente impossível retirar, sem um grande dispêndio de energia e custos, todo o solvente residual. Isso pode resultar em alterações químicas nas moléculas e provocar efeitos tóxicos nos consumidores (MELECCHI, 2005).

Para que a execução da extração por solvente ocorra com êxito, é necessário levar em consideração alguns parâmetros como a distribuição e proporção do constituinte solúvel no sólido. Alguns fatores exercem influência na velocidade de extração, tais como a seletividade do solvente, o tamanho das partículas sólidas, viscosidade, a polaridade do solvente, a acidez do meio, a agitação, a temperatura, a pressão e o tempo de extração (SIMÕES et al., 2004).

Existem diversas técnicas para a extração sólido-líquido de produtos naturais, a escolha mais adequada dependerá de natureza do material botânico utilizado e para que fins serão utilizados o produto. Alguns fatores como localização geográfica, época da coleta, forma de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento podem influenciar no rendimento e no perfil químico dos extratos de plantas (SOARES et al., 1998). Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido, considerando principalmente a finalidade do extrato que se quer preparar (SIMÕES et al., 2004).

A seguir, alguns exemplos de extração por solvente de produtos naturais são mostrados:

3.5.2 Maceração

Maceração é um método de extração que consiste em manter em contato o material botânico a ser extraído e o líquido extrator em quantidades preestabelecidas, durante um intervalo de tempo que podem ser horas ou dias, em recipiente fechado, âmbar ou que não permita contato com a luz à temperatura ambiente (SHARAPIN et al., 2000).

A extração sólido-líquido maceração não esgota o material botânico, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Se for necessário, pode realizar uma re-maceração, no qual o procedimento é refeito empregando a mesma matéria-prima utilizada no processo anterior, mas com um líquido extrator novo (SIMÕES et al., 2007; NÓBREGA, 2012).

Há dois tipos de extração, nas quais podem ser usadas de acordo com o planejamento estudado: maceração estática e maceração dinâmica. A agitação é o que difere as duas, uma vez que na maceração estática a solução permanece em repouso durante o tempo de extração pré-estabelecido e é realizada somente uma vez ao dia ou a cada troca de solvente, por outro lado na maceração dinâmica a agitação é constante durante todo o processo de extração (NÓBREGA, 2012).

- Maceração Estática – operação em que a extração do material vegetal ocorre em recipiente fechado, durante um período prolongado, em temperatura ambiente, com ou sem renovação do líquido extrator (SIMÕES et al., 2007).

- Maceração Dinâmica – extração em que a matéria-prima orgânica fica em contato com o solvente agitado mecanicamente, com isso, o líquido extrator fica sob agitação durante o período de processo extrativo (SIMÕES et al., 2007).

3.5.3 Percolação

Percolação é um processo que tem por objetivo passar o líquido extrator através do material a ser extraído, até ser completamente esgotado. Ocorre uma extração exaustiva da droga vegetal sempre com o solvente renovado. A matéria-prima deve ser umedecida previamente com o solvente durante um intervalo de duas horas em recipiente fechado (SHARAPIN et al., 2000).

Em pequena escala, a percolação é empregada em extratores, denominados percoladores, que podem ser cônicos ou cilíndricos, apresentam uma torneira em sua parte

inferior, com o intuito de regular o fluxo do solvente. A altura de carga de matéria prima no percolador deve corresponder a cinco vezes o diâmetro médio do equipamento (SHARAPIN et al., 2000).

3.5.4 Soxhlet

Extração por Soxhlet é um processo contínuo e um caso particular da extração sólido-líquido. É um método bastante empregado para extrações de matrizes sólidas, como em extrações de propriedades ativas em material botânico. Porém apresenta determinadas restrições relacionadas ao tempo de extração a qual pode chegar a 72 horas. Nesse procedimento, o solvente extrai os componentes da amostra à temperatura ambiente; todavia o material extraído é colocado em contato com o solvente em ebulição por todo o tempo de extração e, em algumas ocasiões, isto pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos (MIGUEL et al., 1989; SANTOS, 2013).

3.5.5 Extração por ultrassom

Nesta técnica o material botânico é misturado ao solvente e ambos são colocados em um recipiente, que é imerso em um banho de ultrassom. Usualmente, a amostra é submetida a vários solventes em ordem crescente de polaridade. O tempo de extração é determinado de acordo com os compostos ativos que serão extraídos. A frequência utilizada é a própria do banho. Após a extração, o material é submetido à filtração e concentração (RODRIGUES, 2002).

3.5.6 Extração por micro-ondas

Nesse método a matéria-prima é posta em contato com água destilada (solvente) e ambos são colocados em um balão de fundo redondo. O balão vai para um forno micro-ondas, já programado com a potência e o tempo de extração desejados. Inicia-se o processo extrativo quando o solvente atinge seu ponto de ebulição e leva consigo as propriedades ativas presentes no material botânico para o condensador. O condensado é depositado no coletor. A separação do óleo essencial é realizada por centrifugação (NASCIMENTO, 2011).

3.5.7 Extração por fluido supercrítico

No método de extração de sólidos com fluido supercrítico o material tem que ser macerado ou moído para facilitar a extração. Após a preparação do material ele é colocado no cilindro extrator. Em cada uma das extremidades do cilindro há a presença de uma

capa protetora constituída de metal poroso que permite a livre circulação do fluido supercrítico e das substâncias que serão dissolvidas, enquanto o resíduo permanece intacto. Quando o fluido extrator passa no material botânico, as substâncias ativas são dissolvidas e extraídas até um nível de solubilidade de equilíbrio, que é de cerca de 10% p/p. A solução gasosa sai do extrator e passa através de uma válvula redutora de pressão, causando a precipitação dos componentes no separador; As propriedades ativas são separadas do fluido extrator e então são recicladas pelo compressor, continuando o ciclo até que todos os componentes sejam extraídos e coletados no separador. O fluxo do solvente, a quantidade de gás, a pressão, a temperatura e o número de ciclos de extração são selecionados de acordo com os componentes a serem extraídos (TREASE, 1996).

3.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos formam o grupo mais numeroso e amplamente distribuído de produtos naturais dentre os metabólitos secundários (TSAO, 2010; HERRMANN; WILLENS; JANKE, 2001; RON; WILLS; MORGAN, 2000; SIMÕES et al., 2000).

Esse vasto grupo está incluso em uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. São estruturas que atuam como antioxidantes, seja pela sua habilidade em doar elétrons ou hidrogênio, seja por seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de lipídios. (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Compostos fenólicos apresentam diversos grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas ligados a um anel aromático, podendo ter vários grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas, outras estruturas cíclicas não aromáticas, dentre outras (NYCHAS, 1995; CASTRO et al., 2004). Com base em sua estrutura e na forma como os anéis fenólicos ligam entre si, são classificados em fenóis simples, ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos, estilbenos, flavonóides, biflavonóides, taninos, ligninas, entre outras (Tabela 02) (BALASUNDRAM, SUNDRAM; SAMMAN, 2006; RICE-EVANS, MILLER; PAGANGA, 1996; LORDÊLO, 2010).

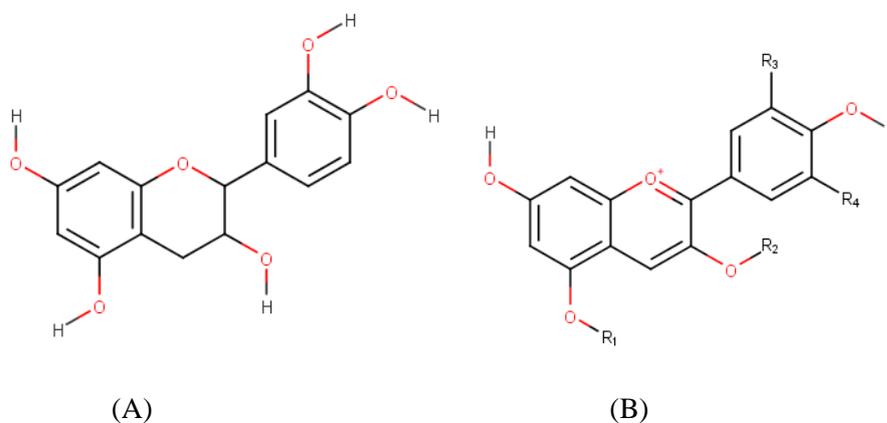
Tabela 02. Classes e estruturas químicas dos compostos fenólicos

Classes	Estrutura química
Fenóis simples	C ₆ -
Ácidos benzoicos	C ₆ -C ₁
Acetofenonas, Ácidos fenilacéticos.	C ₆ -C ₂
Ácidos cinâmicos	C ₆ -C ₃
Naptoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, Isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados ou proantocianidinas	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Fonte. Balasundram; Sundram; Samman (2006)

Os grupos de compostos fenólicos amplamente distribuídos nos vegetais são os flavonoides, os quais apresentam muitas variações tais como flavonóis, flavonas, catequinas (Figura 05 A), antocianinas (Figura 05 B), isoflavonas e chalconas. Podem ser encontrados em bebidas como cerveja, vinho tinto e chá e em alimentos como café e cebola (LORDÊLO, 2010).

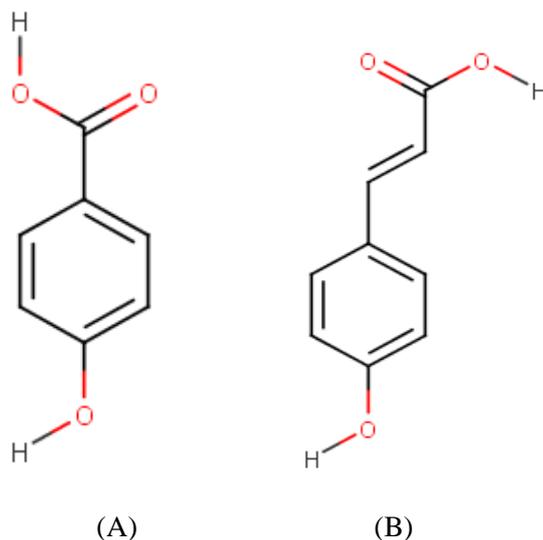
Figura 05. Exemplos de flavonóides comumente encontrados: (A) catequinas e (B) antocianinas



Dentro dos não-flavonoides, podemos encontrar derivados dos ácidos hidroxilbenzóico (Figura 06 A) e hidroxicinâmico (Figura 06 B). A posição dos grupos

hidroxilas e com a proximidade do grupo $\text{-CO}_2\text{H}$ em relação ao grupo fenil garantem a atividade antioxidante dos não-flavonoides (LORDÊLO, 2010).

Figura 06. Algumas estruturas do tipo não-flavonoides: (A) ácidos hidroxilbenzóico e do (B) hidroxicinâmico.



Como mostrado anteriormente, uma das principais características dos compostos fenólicos é a sua capacidade antioxidante. Além disso, estudos mostram que sua atividade antimicrobiana e antifúngica é elevada (ALMAJANO et al., 2008). Segundo Wen et al. (2003), os ácidos hidroxicinâmicos (não-flavonóide) apresentam um efeito bacteriostático frente a pHs elevados.

3.7 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTO

Nos dias atuais, as empresas apresentam condições efetivas para determinar qual o método de melhoria contínua que pode ter um diferencial sobre seus concorrentes. Softwares de controle estatístico ajudam na análise das diversas variáveis para que haja uma tomada de decisão gerencial viável. Com isso, o êxito no direcionamento de esforços para os processos ocorre com mais facilidade. O planejamento experimental se mostra como uma forma de verificação de processos produtivos ou prestação de serviços, ou ainda de projetos mais amplos e complexos (FONTÃO, 2008).

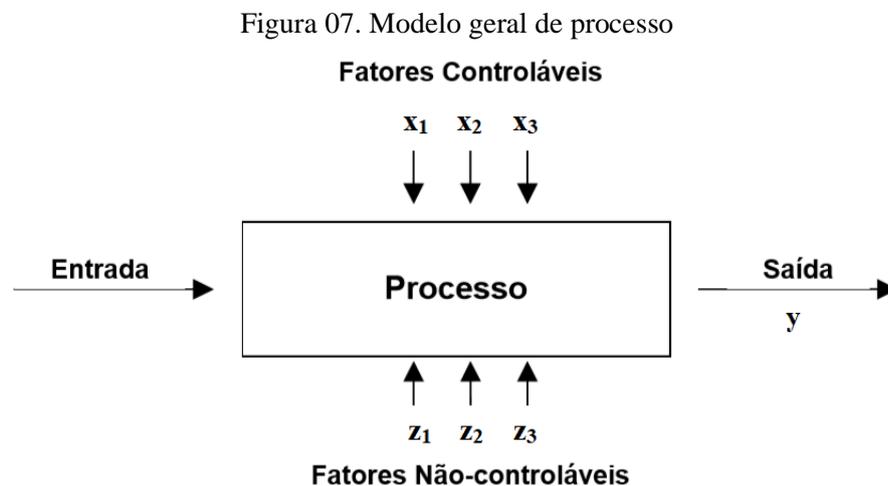
O método estatístico promove as relações dos fenômenos entre si para obter generalizações sobre sua natureza, ocorrência e ou significados. De acordo com Ribeiro, Alves e Silva (2003), o método estatístico é um artifício de análise planejada, no qual

permite a obtenção de conjuntos complexos e representações simples para assim, constatar se essas verificações apresentam relações entre si.

A atividade estatística mais importante não é aquela que somente analisa os dados, mas também planeja experimentos em que esses dados sejam obtidos (BARROS NETO, SCARMINIO; BRUNS et al., 2007).

Para a execução de técnicas de planejamento de experimentos há a necessidade de execução de uma grande quantidade de cálculos, o que requer o emprego de determinados softwares computacionais de análise estatística para facilitar o desenvolvimento desta técnica. Dentre esses softwares, pode-se citar: Minitab Statistical Software, Software Statistica e Design Expert. Esses programas desempenham tarefas de estatística básica, como testes de hipóteses e intervalos de confiança, realizam cálculos de regressão linear, análise de variância, gráficos de superfície de resposta, planejamento fatorial, dentre outros (TAHARA, 2008).

A Figura 07 mostra um processo de transformação de produtos, onde as variáveis controláveis (x_1 , x_2 e x_3) e não controláveis (z_1 , z_2 e z_3) são combinadas e geram um resultado (y). Sendo que as variáveis de saída do processo podem apresentar uma ou mais características de qualidade observáveis (MONTGOMERY, 2004).



Fonte. MONTGOMERY, 2004

As vantagens quando se emprega o planejamento de experimentos são inúmeras. Uma delas é a redução do número de experimentos ou repetições e o melhoramento da qualidade da informação obtida por meio dos resultados. Isso faz com que haja uma diminuição do trabalho para a execução dos experimentos e, como consequência, do

tempo e do custo final do processo. A análise com base nos fatores pode-se verificar e quantificar os efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse. Essa característica permite que a otimização de mais de uma variável de saída seja realizada, além de ser possível, calcular e avaliar o erro experimental. O emprego do planejamento experimental dependerá da competência do profissional que quem faz seu uso, uma vez que mais importante que os conhecimentos em estatística é o conhecimento de sua área de atuação (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Para gerar um projeto experimental, é preciso um número de combinações de testes experimentais. Muitos projetos experimentais fracionários são utilizados, onde descartam-se os efeitos de mais alta ordem que, na prática, não influenciam significativamente na variável de saída, além de aumentarem o número de experimentos a serem executados (COSTA; FARIA et al., 1998).

Um exemplo do planejamento experimental é o denominado de 2^k , onde k representa o número de variáveis e 2 o número de níveis. Experimentos fatoriais são demasiadamente empregados em locais onde as fontes externas de variação são geralmente bem controladas ou em laboratórios (COSTA; FARIA et al., 1998).

3.8 PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN (PBB)

O modelo Box-Behnken apresenta um arranjo de três níveis (3^k) para o estudo da quantificação de variáveis, em um planejamento de experimentos. Esse arranjo é formado pela combinação fatorial $2k$ e um delineamento de bloco incompleto, onde apresenta repetição do ponto central, para se medir a variabilidade experimental, mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (BOX; BEHNKEN, 1960).

Esse planejamento permite que seja possível a construção de um modelo experimental de segunda ordem onde se pode otimizar ou caracterizar um processo com um menor número de experimentos. O modelo apresenta um nível intermediário (0) estabelecido para a condição de fatores.

O número de experimentos necessários para executar o modelo PBB é mostrado na Equação (01), onde N é o número de experimentos, k o número de variáveis e N_0 é o número de pontos centrais:

$$N = 2k(k - 1) + N_0 \quad (01)$$

A matriz de planejamento de Box-Behnken para 3 variáveis de entrada é mostrada na Tabela 03, onde constam 3 repetições no ponto central totalizando 15 corridas experimentais.

Tabela 03. Matriz de planejamento de Box-Behnken em ordem padronizada

CORRIDAS	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fonte. BOX; BEHNKEN, 1960

Em comparação com um planejamento fatorial completo que apresenta 3 variáveis e 3 níveis com 27 experimentos, o Box-Behnken com apenas 13 experimentos mostra ser mais econômico pelo fato de reduzir números de experimentos e eficiente por gerar menos coeficientes, haja vista que a eficiência de um desenho experimental pela razão entre o número de coeficientes gerados pelo número de experimentos executados (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2007). O PBB diferencia-se do planejamento composto central (PCC), uma vez que não contém pontos nos extremos da região cúbica, criado pelos dois níveis fatorial, e contém um ponto central e possui maior eficiência. A “eficiência de um planejamento” é definida como sendo a divisão entre o número de

coeficientes estimados pelo modelo e o número de experimentos. A Tabela 04 mostra a eficiência dos planejamentos PCC e PBB, para uma réplica ($N_0 = 1$).

Tabela 04. Comparação da eficiência dos planejamentos PBB e PCC

Variáveis (k)	Número de coeficientes (p)	Número de Experimentos (N)		Eficiência (p/N)	
		PCC	PBB	PCC	PBB
2	6	9	-	0,67	-
3	10	15	13	0,67	0,77
4	15	25	25	0,60	0,60
5	21	43	41	0,49	0,61
6	28	77	61	0,36	0,46
7	36	143	85	0,25	0,42
8	45	273	113	0,16	0,40

Fonte. BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2007

3.9 ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Segundo Montgomery; Myers (1995), a metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês Response Surface Methodology) é uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas, o qual é empregada para analisar e modelar problemas as quais a resposta de interesse é influenciada por muitas variáveis e nos quais a resposta deva alcançar um valor ótimo, sendo a relação da variável de resposta e as variáveis independentes seja desconhecida. A técnica de superfície de resposta tem sido empregada para otimizar diversos processos, minimizando o número de experimentos, em sua maioria trabalhosa e dispendiosa, permitindo a otimização do processo e melhorando a qualidade dos produtos (ANDRADE, 2009).

A superfície de resposta é um gráfico que descreve o comportamento da resposta em função de fatores tomados dois a dois, permitindo, assim, avaliar quais fatores afetam o sistema. A função matemática que descreve a superfície de resposta é mostrada pela Equação (02) onde x_1, x_2, \dots, x_k representam os fatores experimentais, y é a variável dependente (resposta), k é o número de variáveis independentes estudadas e ε é o erro

aleatório associado à determinação experimental (HAALAND, 1989; RODRIGUES; IEMMA, 2005; NETO, SCARMINIO; BRUNS, 2010):

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (02)$$

Para determinar a superfície de resposta é obrigatório a utilização da relação matemática entre a variável dependente e as variáveis independentes. O modelo linear, deve ser o primeiro a ser verificado. Esse modelo é representado pelo polinômio de primeira ordem abaixo, no qual $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ representam os coeficientes desta Equação (03):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (03)$$

Se a análise da variância (ANOVA, do inglês Analysis of Variance) mostrar que o modelo linear não se ajusta bem às respostas experimentais, pois há a presença de uma curvatura na superfície de resposta, a função a ser aproximada no conjunto de resultados é um polinômio de maior ordem, como um modelo quadrático, representado pelo polinômio Equação (04):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (04)$$

Vale ressaltar que a determinação experimental possui sempre um erro aleatório intrínseco. Portanto, o modelo a ser estudado será aquele que possui a soma dos quadrados dos resíduos, ou seja, as diferenças entre os valores observados e as suas estimativas de acordo com o modelo ($\sum e_i^2$, onde $e_i = y_i - \hat{Y}_i$, sendo e_i o resíduo do modelo, y_i é o valor de uma medida experimental i e \hat{Y}_i refere-se ao valor previsto pelo modelo) é mínima, razão pela qual esse método é chamado ajuste por mínimos quadrados, também conhecido como análise de regressão (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

3.10 FUNÇÃO DESEJABILIDADE

Existem diversas possibilidades para descobrir os níveis dos fatores que irão produzir o conjunto de resposta mais satisfatório, onde isto varia de acordo com o problema estudado. Quando o número de fatores significativos avaliados permitir a visualização dos modelos ajustados, e se o número de respostas não for grande demais, pode-se sobrepor as superfícies de respostas e localizar a melhor região por uma análise visual. Entretanto, se o estudo objetiva minimizar ou maximizar uma determinada resposta mantendo as outras respostas sujeitas a determinadas restrições, podemos utilizar métodos de programação linear. Se estes softwares não forem suficientes, pode-se utilizar a metodologia de otimização simultânea (BARROS NETO, SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Sendo um dos métodos mais aplicados na indústria para a otimização simultânea de processos com múltiplas respostas, a função desejabilidade proposta por Derringer; Suich (1980), baseia-se na ideia de que a qualidade de um produto ou processo, com múltiplas características de qualidade é completamente inaceitável, quando pelo menos uma destas características excede os limites desejados em um intervalo de $[0, 1]$, onde 0 significa um valor inaceitável e 1 o valor mais desejável.

A desejabilidade global, D , é mostrada na Equação (05), e nada mais é do que a média geométrica das m desejabilidades individuais, artifício pelo qual a otimização simultânea das várias respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global.

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (05)$$

De acordo com Neto; Scarminio; Bruns (2007), é necessário descobrir os níveis dos fatores que maximizem o valor de D , com a vantagem de que o uso da média geométrica faz com que a desejabilidade global se anule sempre que uma das respostas tiver um valor inaceitável, mesmo que os valores das outras respostas sejam satisfatórios.

Sendo que: m corresponde ao número de respostas.

Vale ressaltar que quando d_m for totalmente indesejável ($d_m = 0$), então a desejabilidade global é igual a zero.

Ao desejar minimizar, maximizar ou adotar um valor mediano de resposta, alguns tipos de funções desejabilidade podem ser utilizadas. As abordadas utilizadas por

Derringer; Suich (1980) podem ser encontradas em programas como o Statistica 7.0, que são baseadas nos princípios a seguir: seja L_i , L_s e M , os valores inferior, superior e mediano, respectivamente, os quais são desejados para a resposta \hat{Y} , com $L_i \leq M \leq L_s$.

Os expoentes s e t determinam a importância da função para encontrar o valor desejado. Para $s = t = 1$, a função desejabilidade aumenta linearmente com M ; para $s < 1$, $t < 1$, a função é convexa; e para $s > 1$, $t > 1$, a função é côncava.

Quando a resposta deve ser maximizada, a desejabilidade individual é definida na forma da Equação (06):

$$d = \begin{cases} 0 & \hat{Y} < L_i \\ \left(\frac{\hat{Y} - L_i}{M - L_i} \right)^s & L_i \leq \hat{Y} \leq M \\ 1 & \hat{Y} > M \end{cases} \quad (06)$$

Quando a resposta deve ser minimizada, a desejabilidade individual é dada pela Equação (07):

$$d = \begin{cases} 1 & M < \hat{Y} \\ \left(\frac{L_s - \hat{Y}}{L_s - M} \right)^t & M \leq \hat{Y} \leq L_s \\ 0 & \hat{Y} > L_s \end{cases} \quad (07)$$

Já quando a resposta é do tipo mediana, a função desejabilidade individual se torna bilateral, onde o valor desejado é encontrado entre o limite inferior e superior, sendo definida pela da Equação (8):

$$d = \begin{cases} 0 & \hat{Y} < L_i \\ \left(\frac{\hat{Y} - L_i}{M - L_i} \right)^s & L_i \leq \hat{Y} \leq M \\ \left(\frac{L_s - \hat{Y}}{L_s - M} \right)^t & M \leq \hat{Y} \leq L_s \\ 0 & \hat{Y} > L_s \end{cases} \quad (08)$$

Os valores de d e D e seus respectivos conceitos de qualidade, podem ser classificados de acordo com os índices sumarizados na Tabela 05 (AKHANAZAROVA; KAFAROV, 1982).

Tabela 05. Estimativas padrão para escala de desejabilidade

Valores d ou D (Desejabilidade)	Descrição da resposta (qualidade equivalente)
0,80 a 1,00	aceitável e excelente
0,62 a 0,80	aceitável e bom
0,37 a 0,63	Aceitável, porém pobre
0,20 a 0,37	valor limite
0,00 a 0,20	Inaceitável

Fonte. Akhanazarova e Kafarov (1982)

3.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)

Antioxidantes são estruturas heterogêneas que, em baixas concentrações, atrasam ou previnem a oxidação de substratos suscetíveis (EVANS et al., 2004). Para considerar um bom antioxidante, algumas características devem ser consideradas, tais como: ser bom doador de elétrons ou hidrogênio ao radical; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura, em função de seu potencial de redução; capacidade de quelar metais de transição (por exemplo ferro e cobre); acesso ao local de ação, isto é, ter capacidade hidrofílica ou lipofílica (SUCUPIRA et al., 2012).

Logo, a atividade antioxidante presente em produtos naturais, sobretudo a inibição da reação em cadeia, é um parâmetro notável na determinação do potencial quimiopreventivo (CERQUEIRA et al., 2007).

As atividades antioxidantes de derivados vegetais têm sido avaliadas por diferentes métodos, dentre eles pode-se citar os colorimétricos que estão relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais como o DPPH; (Figura 08 A e B) ou ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis/(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)] (HOTTA et al., 2001; BLASCO et al. 2004; MORIMITSU; OKAZAKI, 2009).

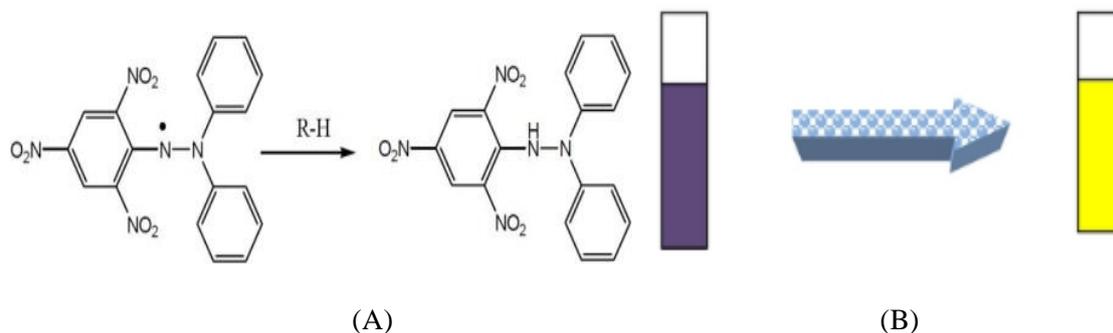
O sequestro do radical livre DPPH foi um método sugerido inicialmente na metade do século XIX, com o intuito de descobrir doadores de hidrogênio em produtos naturais, e, posteriormente para determinar o potencial antioxidante em fenólicos individuais e alimentos (ROGINSKY; LISSI, 2005). É um dos métodos mais utilizados para verificação da atividade antioxidante (TIVERON, 2010).

Esta técnica consiste em medir a capacidade de captura do DPPH pelos compostos antioxidantes, sendo que o 2,2-difenil-1-picrilhidrazina fornece um máximo de absorvância no comprimento de onda de 515 nm. Após a adição do antioxidante, observa-se uma diminuição da absorvância, proporcional à concentração e à atividade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995).

É necessário ressaltar que existem dois parâmetros que apresentam muitas variações quando aplicados: a concentração inicial de DPPH e o tempo de reação. A concentração inicial pode variar de 0,025 g/L a 0,415 g/L. Já o tempo de reação pode ser fixo de 30 minutos ou o tempo que leva para alcançar o estado de equilíbrio. Na literatura, observam-se, entretanto, características comuns: o emprego de solventes (metanol, etanol) e o monitoramento da cinética da reação. (TIVERON, 2010).

Segundo Tiveron (2010), uma vantagem deste método é que o radical livre é estável e está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas além de facilitar seu uso.

Figura 08. Processo antioxidativo (A) reação para capturar o DPPH e (B) alteração de coloração.



Fonte. OLIVEIRA, 2015

3.12 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

O conjunto de átomos de hidrogênio (núcleos) apresenta um determinado estado de spin nuclear, que acaba reagindo com o campo magnético externo, e com isso, é possível desdobrar em dois estados, semelhantes a níveis de energia quando se discute excitação eletrônica, mas nesse caso são aberturas de dois níveis de energia para os prótons. Ao aplicar uma determinada radiofrequência, parte dos núcleos saem do estado fundamental, estado de menor energia, e passam para o estado de maior energia. A diferença de energia emitida é dita ressonância magnética nuclear (RMN).

O RMN permite a obtenção de informações estruturais e dinâmicas para todos os estados da matéria. É comumente aplicada para se determinar estruturas moleculares em estado líquido. Ganha destaque em análises de fluidos biológicos, órgãos de seres vivos, produtos alimentares. A caracterização sinal de RMN da água em diferentes ambientes gerou, também, o domínio do homem sob a imagem por ressonância magnética, que é amplamente utilizada em áreas como medicina, física e química (BANDOCH, 2008).

Em laboratórios de química a técnica de RMN é comumente empregada para a determinação de estruturas de produtos naturais. Todavia indeterminações de estereoquímica e de deslocamentos químicos são comumente encontradas durante a análise de moléculas através da ressonância magnética nuclear. Com isso houve uma crescente procura de softwares de modelagem molecular como alternativa promissora para auxiliar as técnicas empíricas de RMN. Através disso, foi possível obter resultados

precisos e em tempos consideravelmente pequenos (BRASIL et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

A relação entre as previsões teóricas e os resultados obtidos experimentalmente mostra o quão importante são as simulações computacionais na ciência. A melhoria de algoritmos que utilizam softwares de cálculos quânticos junto com o desenvolvimento de computadores fez com que cálculos *ab initio*, com metodologia DFT, para moléculas orgânicas se transformassem em uma ferramenta amplamente utilizada em estudos de dados de RMN de produtos naturais. (FARIAS, 2013; SOUZA et al., 2015; STEINBECK, 2004).

3.13 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular é um método que pressupõe a orientação mais estável na qual uma estrutura molecular irá acoplar a outra. Descobrir a melhor orientação é possível prever as afinidades de ligação ou forças de associação entre ambas as moléculas. Este é compreendido como um procedimento virtual que objetiva acoplar ou colocar computacionalmente uma molécula (inibidor) em sítios de ligação de uma macromolécula biológica (alvo molecular) (COHEN et al., 2010; LENGAUER; RAREY, 1996; SOTRIFFER et al., 2000). Ao selecionar o alvo molecular, a estrutura que irá ligar-se a ele pode ser utilizada como potencial molécula terapêutica (SHOICHET, 2004).

O processo de interação entre as moléculas envolve fatores como entrópicos (energia termodinâmica oriunda das reações químicas ocorrentes) e fatores entálpicos (energia máxima interna do sistema). Ao considerar a flexibilidade da estrutura ligante e da proteína alvo, o ambiente proteico na distribuição de cargas do ligante pode interagir com moléculas de água no meio (SOUZA, 2012).

A combinação das componentes algoritmo de busca e função de pontuação são descritas como protocolos de docagem molecular. O algoritmo busca possíveis combinações nas ligações, resultando na exploração de graus de liberdade translacional e rotacional e conformacional da estrutura ligante e da proteína alvo. Já a função de ligação é empregada para obter os modos de ligação mais apropriados (mais próximos dos resultados experimentais). Para a obtenção das funções score é necessário observar os parâmetros empíricos de cálculos de energia, bem como os campos de força mecânica (DE MOLFETTA, 2007; VERDONK et al., 2003).

3.14 MICROORGANISMOS

As doenças infecciosas, sobretudo causadas por bactérias e fungos, são causadoras de morbidade e mortalidade, especialmente em países em desenvolvimento (BETONI et al., 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde, as infecções são responsáveis por 25% das mortes em todo o mundo e 45% em países desenvolvidos (WHO, 2001).

Os antimicrobianos ou antibióticos são fármacos utilizados com o intuito de provocar a morte ou inibir o crescimento de determinado agente microbiano. Eles são oriundos de substâncias geradas pelos próprios microrganismos e podem ser de origem vegetal ou mesmo sintéticas (TRABULSI; GUILLONNEAU 2005).

Porém a resistência microbiana aos antibióticos é um problema de grande relevância enfrentado nas últimas três décadas. Um microrganismo é resistente a um antibiótico quando é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória mínima deste fármaco. A resistência pode ser natural, onde os genes da bactéria codificam enzimas que inativam o mecanismo de ação do fármaco; ou adquirida, quando a bactéria se torna resistente a um fármaco sensível, por meio da aquisição de fatores genéticos ou mutação em seus genes de defesa (TAVARES, BERTOLDI; MUCCILLO-BAISCH, 2008)

Com o aumento de microrganismos patogênicos resistentes a diversas drogas associado com crescimento do número de pacientes imunocomprometidos, surge a preocupação para a procura de alternativas terapêuticas (ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA, BRANDELLI; TONDO, 2006; JOHANN et al., 2007).

Diversas medidas são propostas para sanar esse problema, sendo uma delas a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais (BELLA CRUZ, 2010).

Pesquisas com vegetais têm comprovado seu potencial antimicrobiano no tratamento de diversas patogenias. Com isso, há uma enorme busca pela recuperação de pesquisas sobre a atividade antimicrobiana, mecanismo de ação e potenciais de usos destas espécies (LIMA et al., 2006).

Os antimicrobianos adquiridos através do uso de plantas medicinais têm sido uma excelente alternativa para o tratamento de patogenias devido aos seus altos potenciais terapêuticos e uma ótima via para países em desenvolvimento, haja vista que estes apresentam uma vasta biodiversidade a ser explorada, como é o caso do Brasil (CALIXTO, 2005). Ademais, o uso desses vegetais é mais vantajoso que os antimicrobianos sintéticos, uma vez que os efeitos colaterais são diminutos (BELLA CRUZ et al., 2010). Como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana de

plantas medicinais têm-se alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas (SOUZA et al., 2007).

Crê-se que diversos óleos essenciais apresentam um efeito antimicrobiano através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo, alterando a permeabilidade de membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons hidrogênio (H^+) e potássio (K^+), resultando na interrupção dos processos essenciais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, causando perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, provocando a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000).

As bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas. As diferenças entre esses grupos são baseadas principalmente nas suas propriedades de permeabilidade nos componentes de superfície (JAY, 2005).

A parede celular desses microrganismos é constituída principalmente de peptideoglicano, um polímero misto de açúcares e aminoácidos. Quando se fala de bactérias Gram-positivas, este polímero apresenta uma camada espessa (20-80 nm) externa a membrana celular e pode conter outras moléculas. Já as Gram-negativas, a camada peptideoglicana é delgada (5-10 nm) e superposta por uma membrana externa, ancorada a moléculas lipoproteicas no peptideoglicano (TRABULSI et al., 1999).

Destarte, o presente estudo busca analisar as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), as Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*) e o fungo *Candida albicans*, frente a moléculas da planta *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ.

▪ *Candida albicans* é definida como levedura que frequentemente está envolvida na etiologia de infecções. Candidíase é caracterizada como a infecção fúngica mais comum, sendo seu agente etiológico mais frequente a *C. albicans*. Podemos encontrar outras espécies nos quais estão incluídas no gênero *Candida*, como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, onde também podem transmitir a candidíase. Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica (LIMA et al., 2006).

▪ *Staphylococcus aureus* é conhecido como um importante patógeno humano há vários anos (KLUYTMANS; WERTHEIM, 2005). Microrganismo de caráter versátil, *S. aureus* é responsável por diversas doenças, incluindo pneumonia, osteomielite, bacteremia, infecções da pele, de feridas, do sistema nervoso central, do trato urinário e

infecções associadas com dispositivos intravasculares, septicemia, endocardite dentre outras. (CROSSLEY et al., 1997; FEIL et al., 2003; FEY et al., 2003; GORDON ; LOWY, 2008). Esta bactéria tem despertado a atenção das indústrias alimentícias pela resistência a altas temperaturas, a desinfetantes e a soluções antissépticas, além de apresentar elevada capacidade em desenvolver resistência a diversos antibióticos ativos contra bactérias Gram-positivas (FORSYTHE, 2002).

▪ *Salmonella thyphimurium* apresenta uma ampla variedade e espécies (mais de 2.300 variedades sorológicas). Esta bactéria pode transmitir patologias, como gastroenterite, infecção intestinal do endotélio vascular e febre tifoide. Sendo que estas infecções variam de acordo com o tipo sorológico da bactéria, idade e estado imunológico do hospedeiro. (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SCHAECHTER et al. 2002).

3.15 ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUTASE: *Candida albicans* (PDB ID: 1AI9)

A busca de agentes antifúngicos, principalmente em inibidores da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), vem sendo estimuladas uma vez que o aumento de infecções fúngicas estão aumentando principalmente entre pacientes com AIDS. A inibição de DHFR é um mecanismo bem estabelecido de ação da droga. O DHFR catalisa a redução de ácido di-hidrofólico em ácido tetra-hidrofólico (FH4). Quando não há a sintetização do DNA como resultado da inibição do DHFR há a ocorrência de morte celular (CHAN et al.,1995; STERNBERG, 1994; SCHWEITZER, DICKER; BERTINO, 1990).

A escolha do DHFR como alvo molecular para a geração de agentes antifúngicos é complicada uma vez que a enzima está presente em microorganismos e humanos. Logo, com o intuito de minimizar as toxicidades relacionadas ao DHFR para o hospedeiro humano, o agente antifúngico deve ter a capacidade de inibir precisamente a enzima fúngica. Tal inibição seletiva da espécie de DHFR pode ser útil em outras aplicações terapêuticas (CHAN et al.,1995).

3.16 ENZIMA tirosil-tRNA: *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 1JIJ)

Tirosil-tRNA sintetase é considerada uma enzima extremamente atraente para a geração de novos agentes antimicrobianos (XIAO et al., 2011). É pertencente às aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs) onde é responsável pela catalização da ligação covalente de aminoácidos ao seu respectivo tRNA com o intuito de constituir tRNA

carregado. Portanto, a inibição da aarSs afetará o crescimento celular devido ao seu papel essencial no processo de biossíntese das proteínas (PISANO et al., 2019).

Um aminoácido é condensado com uma molécula de ATP para gerar o intermediário aminoacil-adenilato estável e então é levado para um tRNA cognato gerando um produto desejado (FERSHT et al., 1985). Devido ao papel essencial das sintetases, os inibidores das aminoacil-tRNA podem ser drogas bacterianas promissoras (SCHIMMEL, TAO; HILL, 1998).

Uma vez que bactérias multirresistentes estão cada vez mais prevalentes e são uma ameaça à saúde pública, é possível obter quantidades significativas de aminoacil-tRNA sintetases, em especial com cepas virulentas como *Staphylococcus aureus*, e usá-las para geração de inibidores através de triagem de alto rendimento de bibliotecas de compostos (QIU et al., 2001).

3.17 ENZIMA SIALIDASE: *Salmonella thyphimurium* (PDB ID: 1DIM)

Sialidases catalisam a remoção de ácido de diversos gliconjugados. Em animais, foram localizadas em muitos tecidos, onde as enzimas realizam funções como regulamento do perfil do ácido siálico da superfície de células. Essa regulação é útil para a apoptose, sistema imunológico e para as meias-vidas da célula circulante. A nomenclatura ‘ácido siálico’ é uma nomenclatura genérica para uma vasta família de análogos, as quais ocorrem naturalmente, do ácido N-acetil neuramínico. A ocorrência de vários análogos está relacionada com o tipo de célula, tipo de tecido, idade celular e espécie, que protegem o ataque de sialidases em glicoconjugados. Portanto, o equilíbrio das sialidases e dos ácidos siálicos são importantes para ajustar determinados fenômenos em células animais (SCHAUER, 1985; PITTATTE; BIGNON; LAMBRE, 1993; BRATOSIN et al., 1995; PETER et al., 1995; VRKI, 1992; TAYLOR, 1996).

Há uma grande exploração de patógenos microbianos na localização dos ácidos siálicos em terminais de diversos complexos de carboidratos associados a células animais. Patógenos, como a *Salmonella thyphimurium*, reconhecem o ácido siálico para ligação celular e esses microorganismos que aderem as sialidases a utilizam como auxiliador de suas necessidades nutricionais e/ou na sua patogênese (TAYLOR, 1996).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Obtenção do material botânico

As cascas do caule de *Croton pullei* LANJ. foram coletadas no município de Peixe-Boi, à 157 km da capital Belém, no estado do Pará com coordenadas $1^{\circ}06'04.6''\text{S}$ $47^{\circ}19'43.7''\text{W}$ (Figura 09), utilizando o aplicativo Google Maps. A coleta foi realizada no período matutino, no décimo nono dia do mês de Outubro de 2020 (Figura 10).

Figura 09. Local de coleta da planta *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. (Coordenadas $1^{\circ}06'04.6''\text{S}$ $47^{\circ}19'43.7''\text{W}$)

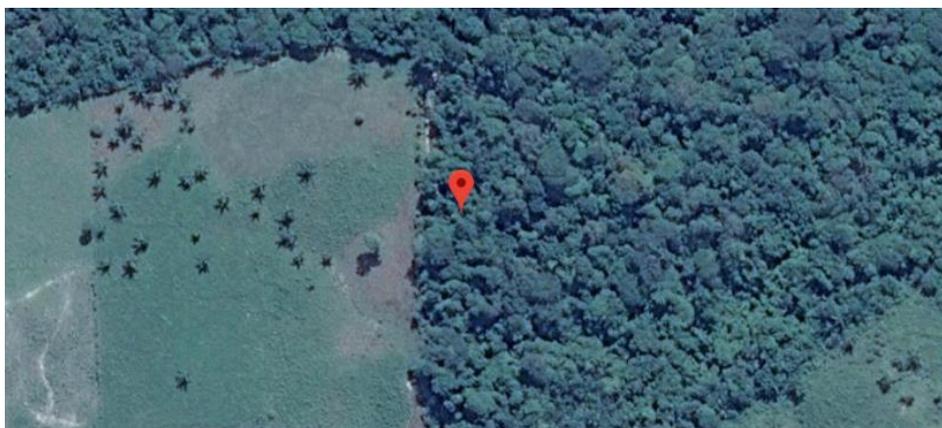


Figura 10. Material coletado



As cascas do caule do material botânico foram secas em estufas com ar circulante à 40°C por 72 horas, para remoção prévia de umidade. Posteriormente as matérias-primas foram submetidas a processo de trituração utilizando moinho de facas (Figura 11). Após isso, realizou-se a análise granulométrica obtendo material do tipo pó fino, médio e grosso nos quais foram destinados ao planejamento experimental utilizando extração do tipo sólido-líquido em um extrator de aço-inox. A casca do caule do *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. foi pesada obtendo uma massa em torno de quatro quilos (3.996,56 gramas), deste material foram pesadas quinze amostras de cem gramas (100 g), cada uma, sendo quatro amostras do material dito pó fino, sete do pó médio e quatro do pó grosso.

Figura 11. Moinho de facas



4.2 MÉTODOS

4.2.1 Determinação da Umidade esidual

O teor de umidade pode ser determinado através de três métodos distintos, sendo eles: o gravimétrico, o azeotrópico e o de Karl Fischer (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; RODRIGUES, 2017).

Foi empregado neste estudo o método gravimétrico com balança por infravermelho, no qual consiste em colocar uma porção da amostra a ser analisada no coletor de alumínio que está contido dentro do aparelho, acionar o mesmo e anotar o valor, em percentual, da umidade que aparecerá no aparelho, após alguns minutos de funcionamento. (RODRIGUES, 2017).

Preparou-se uma amostra representativa, homogênea e isenta de impurezas. Colocou-se na bandeja do aparelho 2g de material botânico. Ao se passar 20 (vinte) minutos um alarme soa e o display do aparelho mostra o percentual de umidade da amostra. A leitura foi realizada em um analisador de umidade por infravermelho (Figura 12) (modelo IV 2500, marca Gehaka).

Figura 12. Analisador de umidade por infravermelho



4.2.2 Análise Granulométrica

Peneiras da série Tyler (W.S. Tyler, USA) foram selecionadas e pesadas para a realização do estudo em questão. Para a análise empregou-se uma massa total de 3.996,56 g. Após isso, o equipamento foi ligado, depois de 15 min, sob agitação ROTAP (Agitador de Peneiras com Batida Intermitente) (Figura 13), as peneiras foram pesadas novamente para a determinação da quantidade de amostra retida em cada peneira. As massas obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos.

Figura 13. Equipamento ROTAP em funcionamento



4.2.3 Caracterização do Material Botânico

O material botânico foi identificado através da exsicata, realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), campus Belém, pelos especialistas do laboratório de botânica-herbário, Manoel Nascimento, Ednaldo Nascimento e Silvana Tavares. A exsicata de código 01, foi preparada para sua identificação (Figura 14), acompanhada de um cartão de identificação contendo dados da espécie em questão e de sua coleta.

Figura 14. Exsicata preparada para identificação de sua espécie



4.2.4 Planejamento Experimental de Extração

4.2.4.1 Extração Convencional

O Planejamento fatorial de Box-Behnken (1960) é usualmente empregado quando se deseja otimizar um processo avaliando a sua eficiência. Além disso, possibilita a detecção da necessidade ou falta de ajustes. No estudo do processo de extração do material botânico em estudo foi utilizado um modelo constituído em três níveis (+1, 0, -1), com três replicatas no ponto central, totalizando 15 ensaios.

A temperatura empregada foi em graus Celsius, granulometria em mm e a relação massa fixa de material botânico em gramas, por volume em mL, como variáveis de entrada. Estas foram codificadas por X_1 , X_2 e X_3 respectivamente, como mostra a Tabela 06.

Em relação aos fatores fixos têm-se a agitação (100 rpm), massa do material botânico (100 g) e o tempo de extração (120 min).

Tabela 06. Variáveis de entrada e seus respectivos níveis

VARIÁVEL REAL (UND)	VARIÁVEL CODIFICADA	NIVEIS		
		-1	0	1
Temperatura (°C)	X_1	30	45	60
Granulometria (mm)	X_2	0,094	0,913	1,700
Relação S/L (g/mL)	X_3	1:4	1:5	1:6

Para as variáveis de entrada, o rendimento percentual do extrato obtido, quantificação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante foram avaliados como análise de resposta.

Os testes experimentais foram dispostos de forma aleatória, como é fornecido pela matriz de planejamento (Tabela 07).

Tabela 07. Matriz do Planejamento da Extração Convencional

ENSAIOS	VARIÁVEIS CODIFICADAS		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

X₁= temperatura; X₂= granulometria; X₃= Relação massa solvente

4.2.4.2 Operação do equipamento

Para o processo de extração convencional, utilizou-se em escala laboratorial, um extrator encamisado, feito de aço inoxidável, com agitador mecânico, marca QUIMIS, acoplado a um banho criostático de circulação de fluido, marca HAAKE. A parte superior do extrator dispõe de 3 orifícios, os quais são utilizados um para introdução do agitador mecânico, um para o termômetro e outro era fechado com um bico de vidro (Figura 15). Periodicamente, media-se a temperatura interna do reator. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais (LEPRON) localizado no laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

O agitador era fixo no centro do reator para não se obter falhas rotacionais no decorrer da análise. Sempre que se observava vibrações na lateral do reator, ajustava-se o mesmo de certa forma a minimizar estas vibrações.

O agitador mecânico empregado para a realização deste estudo possui capacidade de até 1.000 rpm, o qual está fixo no suporte do reator; já a hélice do agitador apresenta 3 pás (tipo marinha).

A extração é uma operação cujo objetivo é separar uma substância de interesse de uma matriz sólida ou líquida utilizando um solvente (MARAMBIO; ACUÑA; DEL CARMEN PIZARRO 2007).

O solvente etanol foi escolhido devido a sua alta polaridade, não ser tóxico, ter baixo custo e facilidade de evaporação (uma vez que seu ponto de ebulição é baixo).

Figura 15. Sistema para extração



Após a montagem do extrator e acoplado-o no banho criostático e agitador, os procedimentos a seguir foram realizados:

1. Foram adicionados ao extrator, o material botânico e o solvente (etanol), seguindo o planejamento padrão;
2. A temperatura foi ajustada também de acordo com a matriz.
3. O sistema foi fechado. O agitador ligado;
4. Após o tempo de extração da amostra se esgotar, o extrato foi retirado e separado da torta através de uma filtração simples;
5. A solução filtrada foi colocada em uma vidraria limpa, seca, que foi previamente e posteriormente pesada;
6. A torta foi coberta por um papel alumínio e reservada.

É de extrema importância salientar que o banho criostático é conectado ao extrator para que haja um fluxo de circulação interna do fluido. Ademais o sistema é devidamente

ligado, quando a temperatura (definida pela matriz de planejamento) é atingida, sendo controlada pelo sistema de resfriamento/aquecimento.

Após as extrações convencionais, as amostras foram filtradas à vácuo e posteriormente levadas ao evaporador rotativo (marca QUIMIS, modelo Q344B2), como é ilustrado pela Figura 16. Este equipamento teve a função de retirar o máximo de solvente ainda existente nas amostras. Para isso, utilizou-se a temperatura de aproximadamente 60°C no evaporador rotativo. Esses procedimentos também foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais (LEPRON). Após isso, obtém-se os extratos como mostra a Figura 17 (A) e (B).

Figura 16. Evaporador rotativo em funcionamento



Figura 17. Extratos obtidos da extração (A) com tampa e (B) sem tampa



(A)

(B)

4.2.5 Cálculo do rendimento dos extratos (%)

Para obter o rendimento da extração utilizando as cascas do caule do *C. pullei* LANJ., em base seca, foi necessário aplicar a Equação (09).

$$\text{Rd} = \frac{M_o}{M} \times 100 \quad (09)$$

Onde:

Rd: rendimento da extração (%);

M_o é a massa de extrato obtida experimentalmente (g);

M é a massa da matéria-prima em base seca (g).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

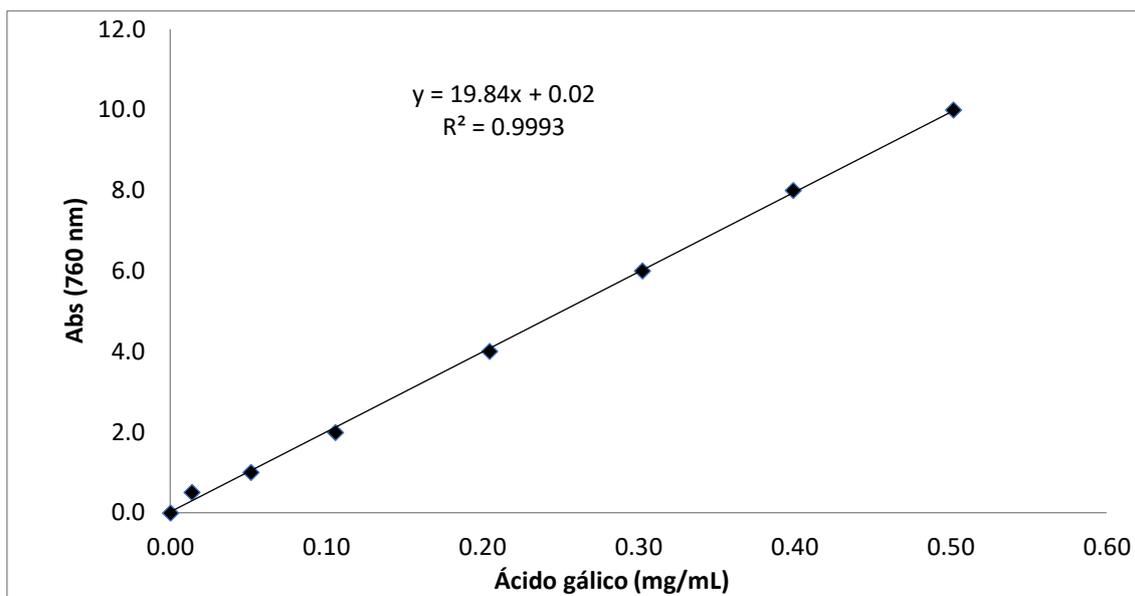
Os compostos fenólicos totais dos extratos do *Croton pullei* LANJ. foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (GUTFINGER, 1981) com algumas alterações, utilizando o ácido gálico para construção da curva-padrão, Figuras 18 e 19. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de peso seco da amostra (mg EAG/g). A determinação dos compostos fenólicos empregando o reagente de Folin-Ciocalteu, baseia-se no princípio de que, em meio alcalino, os fenóis reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico a óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul (GUTFINGER, 1981).

Figura 18. Soluções para construção da curva analítica



As concentrações de ácido-gálico/água são de 40 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 24 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$, da esquerda para a direita respectivamente. O branco é representado pelo ponto zero.

Figura 19. Curva analítica para o teste de quantificação de compostos fenólicos



Onde

R^2 : Coeficiente de determinação

Abs: Absorbância do extrato

Preparou-se uma solução mãe de cada um dos 15 ensaios com 10 mg do extrato bruto para 3 mL de álcool etílico (1:3), posteriormente tiveram seus pHs ajustados para neutro (pH=7), utilizando uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Em cubetas de borosilicato, foram adicionados 0,500 mL de cada amostra, 1,250 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 0,25 mL de Folin-Ciocalteu 1N formando um meio reacional de coloração azulada. Para o branco empregou-se 0,500 mL de água ultrapura, 1,250 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 0,25 mL de Folin-Ciocalteu 1N. O teste foi realizado em triplicata (KAHKONEN, 1999). As cubetas foram isoladas, à temperatura ambiente e após 30 min foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 760 nm (UV-Vis, QUIMIS).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação do potencial antioxidante dos ensaios, utilizou-se o cromóforo DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (CAVIN et al., 1998; BOUCHET et al., 1998). Para a realização do experimento, foi necessário preparar uma solução de DPPH 0,06 mM momentos antes de seu uso. Preparou-se uma solução mãe de cada um dos 15 ensaios com 20 mg de extrato bruto para 1 mL de etanol. Em cubetas de leitura, transferiu-se 0,05 mL da amostra 1,95 mL de solução de DPPH 0,06 mM (AA). A leitura da absorvância

foi realizada em espectrofotômetro, marca QUIMIS, a 517 nm em tempos de 0 min, 15 min, 30 min, 45 min e 60 min. Estabeleceu-se a absorbância do branco com cada uma das soluções dos extratos estudados (0,05 mL) inseridas 1,95 mL em de álcool metílico (AB). Para a absorbância do controle (AC) mediu-se da absorbância da mistura de 1,95 mL de DPPH 0,06 mM (violeta) e 0,05 mL de metanol. O teste foi realizado em triplicata. A atividade antioxidante foi determinada em termos porcentagem de reação segundo a Equação (10). A IC₅₀ determina que quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

$$\% \text{inibição} = \frac{\{AC - (AA - AB) \times 100\}}{AC} \quad (10)$$

Onde:

AA: absorbância da amostra;

AB: absorbância do branco;

AC: absorbância do controle negativo

4.4.1 Preparo da solução de DPPH 0,06 mM

Diluir 2,4 mg de DPPH em álcool etílico e completar o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool metílico, homogeneizar e corrigir se necessário a molaridade, transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado.

4.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR TEÓRICA

Inicialmente realizou-se estudos de modelagem molecular utilizando o programa Avogadro 1.2.0, onde das moléculas foram desenhadas em 3D e pré-otimizadas.

Realizou-se cálculos quânticos a nível DFT via funcionais híbridos B3LYP conjugados com o conjunto de funções de base 6-31 G e cc-pVDZ, empregados para a otimização estrutural e obtenção de dados de RMN (em solvente clorofórmio).

Para obter os dados de RMN, foi aplicado o método GIAO (Gauge Including Atomic Orbitals) com o intuito de facilitar os cálculos precisos de deslocamentos químicos via métodos de correlação eletrônica (WANG et al., 2009). Todos os cálculos

foram realizados no programa Gaussian[®]03 (FRISCH et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2018; SOUZA et al., 2015).

A comparação entre os dados de RMN teóricos e experimentais foi feita através de regressão linear, bem como estatísticas relevantes como grau de ajuste (R^2), desvio-padrão (s), grau de significância (F) e previsibilidade (Q^2 e $sPRESS$) nos quais foram calculados através do software MINITAB 18. Outras estatísticas significantes foram obtidas para aprimoramento dos dados de RMN teórico calculados, como os coeficientes a e b da regressão linear obtidos através da fórmula: $\delta_{calc} = a + b \delta_{exp}$, erro absoluto médio (EAM) onde $EAM = \sum n |\delta_{calc} - \delta_{exp}|/n$ e erro absoluto médio corrigido (EAMC) sendo $EAMC = \sum n |\delta_{corr} - \delta_{exp}|/n$. Ao se obter as equações lineares, foram testadas para seus poderes de ajuste, significância e previsibilidade usando um procedimento de validação cruzada (teste de significância) (NASCIMENTO et al., 2018; SOUZA et al., 2015).

Após a obtenção de cada modelo linear, os dados omitidos são preditos e as diferenças entre valores verdadeiros e valores preditos são calculados. A soma dos quadrados dessas diferenças é determinada e, finalmente, o desempenho do modelo (sua habilidade preditiva) pode ser dado por PRESS (Predictive Sumo of Squares) e $sPRESS$ (Standart Deviation of Cross-validation) (Equações 11 e 12) (GAUDIO e ZANDONADE, 2001; SOUZA et al., 2015),

$$PRESS = \sum_{i=1}^n \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2 \quad (11)$$

$$sPRESS = \frac{\sqrt{PRESS}}{n - k - 1} \quad (12)$$

Onde: y : valor experimental;

\hat{y} : valor predito;

n : número de amostras usadas para obter o modelo e

k : número de parâmetros de RMN.

A habilidade preditiva dos modelos foi também quantificada em termos de Q^2 (equação 13) (GAUDIO e ZANDONADE, 2001).

$$Q^2 = 1,0 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad \text{onde, } \bar{y} = y_{\text{medio}} \quad (13)$$

4.6 DOCAGEM MOLECULAR

Os modelos cristalográficos das enzimas da *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella thyphimurium* foram selecionados através do banco de dados de proteínas laboratório de pesquisa para bioinformática estrutural (<http://www.rcsb.org>) com códigos 1AI9, 1JIJ e 1DIM, complexadas aos ligantes NDP, 629 e EQP, respectivamente.

As moléculas otimizadas pelos cálculos DFT foram utilizadas como entrada para os cálculos de docking. Os cálculos de docagem foram efetuados através da função de pontuação MolDock (programa Molegro Virtual Docker 5.0), com uma resolução de grade de 0,3 Å, para as três enzimas.

A região do sítio ativo foi definida como uma região esférica de 12 Å para a enzima *Candida albicans* e 10 Å para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella thyphimurium*.

Para o abrangendo de todos os resíduos de aminoácidos dos sítios ativos das enzimas foram utilizados valores das coordenadas do centro $x = 27,99$, $y = -7,25$ e $z = 12,13$ (PDB ID: 1AI9); $x = -14,76$, $y = 4,64$ e $z = -21,15$ (PDB ID: 1JIJ); e $x = 43,80$, $y = 50,84$ e $z = 49,61$ (PDB ID: 1DIM) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

5.1.1 Determinação da Umidade do *C. pullei*

A casca do *Croton pullei* apresentou um valor médio de umidade final de 9,8% em base seca, valor este que está de acordo com o estudo de Brandão (2007), o qual indica que a faixa de teor de umidade para materiais botânicos é de 8 a 14 %, haja vista que uma porcentagem de umidade superior pode causar deterioração por contaminação microbiana e transformações químicas dos metabólitos secundários.

5.1.2 Análise Granulométrica da casca do *C. pullei*

Para a análise granulométrica, utilizou-se peneiras Tylers de 12, 35, 60, 65, 270 e 400 mm, além de um coletor no qual determinou-se as faixas granulométricas. As faixas em que as cascas do caule do material botânico ficaram mais retidas foram 0-12 mm e 12-35 mm, apresentando respectivamente 20,06% e 52,83% (Tabela 08 e Figura 20).

Tabela 08. Dados utilizados para os cálculos do Diâmetro médio equivalente de Sauter

TYLER (mm)	MASSA RETIDA (g)	PERCENTUAL DE MASSA RETIDA (%)
12	801,71	20,06
35	2.111,37	52,83
60	394,86	9,88
65	123,49	3,09
270	354,89	8,88
400	210,22	5,26
-400	0,00	0,00
TOTAL	3.996,56	100,00

Determinou-se que o material contido na peneira de 12 mm é dito como pó grosso, o retido na peneira de 35 mm é denominado de pó médio e o contido nos tylers de 60, 65 250 e 400 mm são classificados em pó fino.

Aplicando os valores obtidos com a análise distribuição granulométrica na Equação (11), obteve-se um diâmetro médio equivalente de Sauter para o pó fino, pó médio e pó grosso de 0,094 mm, 0,913 mm e 1,700 mm, respectivamente.

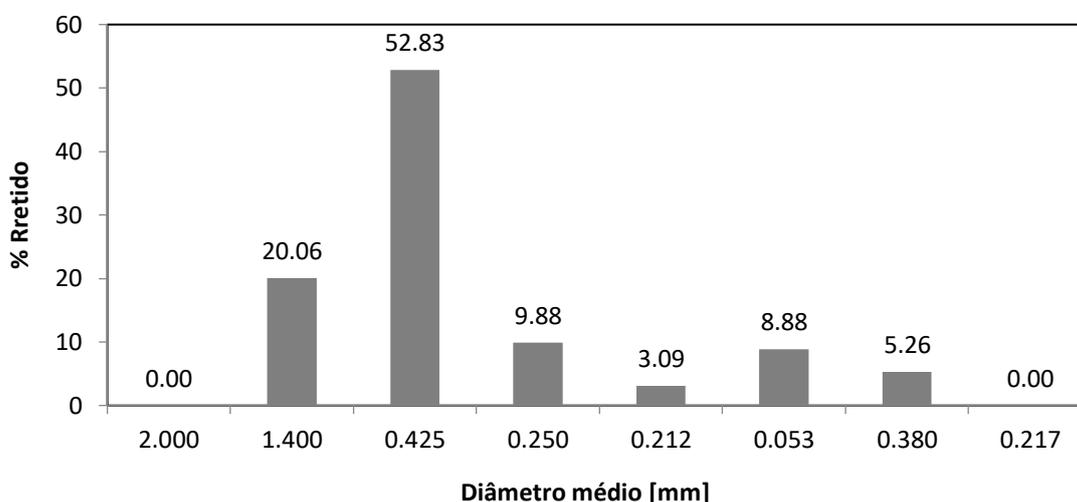
$$D_m = \sum Pr \quad (11)$$

Onde:

D_m = Diâmetro médio de Sauter;

Pr = Produtório obtido.

Figura 20. Gráfico da Distribuição Granulométrica da casca do caule do *C. pullei* VAR



A avaliação granulométrica do material é uma etapa importante da padronização, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Partículas com dimensões homogêneas aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, podendo tornar, desta forma, mais eficiente a operação de extração (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

5.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

5.2.1 Análise de Rendimento

Os ensaios foram executados de acordo com a matriz experimental (Box-Behnken) e a Tabela 09 apresenta as variáveis de entrada codificadas e reais, bem como a variável de saída rendimento em percentagem – Rd (%). O valor máximo e mínimo de rendimento para o estudo de extração de cascas do caule de *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. obtidos

foram para o ensaio 4 ($T= 60^{\circ}\text{C}$; $G= 1,700$ mm; $S/L: 1:5$ g/mL) e ensaio 5 ($T= 30^{\circ}\text{C}$; $G= 0,913$ mm; $S/L: 1:4$ g/mL), com 10,61% e 5,57% respectivamente. Isso mostra que com uma quantidade considerável de solvente, tamanho da partícula da matéria-prima máximo e temperatura elevada resulta em uma alta quantidade de extrato final.

Resultados esses que se assemelham aos de SILVA (2019) na qual também utilizou cascas do caule de *C. pullei* e planejamento experimental Box-Behnken onde obteve maior e menor valor de rendimento para as corridas 2 e 10 com 8,57% ($G= 0,12$ mm, $T= 60^{\circ}\text{C}$ e $S/L= 1:5$ g/mL) e 4,61% ($G= 0,53$ mm, $T= 40^{\circ}\text{C}$ e $S/L= 1:5$ g/mL), respectivamente.

Além das variáveis de entrada propostas neste trabalho, outros fatores puderam ter influência na obtenção da variável de saída rendimento, tais como o tempo de armazenamento entre a coleta da matéria prima e a extração, bem como o solvente empregado no processo extrativo.

Com um grande período de armazenamento entre a coleta e a extração, o material pode absorver umidade, aumentando, assim, a atividade respiratória dos grãos, facilitando a deterioração da matéria-prima. Neste caso, este fator pode ter diminuído os rendimentos do processo.

Tabela 09. Matriz experimental para a variável de resposta Rendimento

ENSAIOS	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS REAIS			RD (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	T (°C)	G (mm)	S/L (g/mL)	
1	-1	-1	0	30	0,094	1:5	6,28
2	1	-1	0	60	0,094	1:5	7,11
3	-1	1	0	30	1,700	1:5	7,51
4	1	1	0	60	1,700	1:5	10,61
5	-1	0	-1	30	0,913	1:4	5,57
6	1	0	-1	60	0,913	1:4	6,68
7	-1	0	1	30	0,913	1:6	6,67
8	1	0	1	60	0,913	1:6	8,00
9	0	-1	-1	45	0,094	1:4	6,61
10	0	1	-1	45	1,700	1:6	8,59
11	0	-1	1	45	0,094	1:4	8,00
12	0	1	1	45	1,700	1:6	10,00
13	0	0	0	45	0,913	1:5	7,14
14	0	0	0	45	0,913	1:5	7,34
15	0	0	0	45	0,913	1:5	7,32

5.2.1.2 Análise estatística da variável de resposta Rendimento (RD)

Na análise da variância (Statistica® 7.0) para a variável de resposta (RD), obteve-se um valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9846 ou 98,46%.

Os resultados adquiridos dos efeitos dos parâmetros estão apresentados na Tabela 10, o qual nos informa que a variável isolada X_1 (temperatura), X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_2^2 e a variável combinada (X_1X_2), são estatisticamente significativas para a variável de resposta rendimento, uma vez que seus

efeitos são maiores quando comparados aos desvios, confirmando que esses efeitos não ocorrem somente devido aos erros experimentais.

Tabela 10. Efeitos Estimados para Rendimento

FACTOR	EFEITOS	ERRO PADRÃO
Média	7,64	±0,03
X_1	1,60	±0,08
X_1^2	0,48	±0,06
X_2	2,18	±0,08
X_2^2	-1,09	±0,06
X_3	1,30	±0,08
X_3^2	0,06	±0,07
(X_1X_2)	1,14	±0,11
(X_1X_3)	0,11	±0,12
(X_2X_3)	0,01	±0,11

X_1 =Temperatura; X_2 =tempo; X_3 =Relação massa/solvente.

As variáveis X_1 , X_2 , X_3 , X_1^2 e X_1X_2 geram um efeito positivo na variável de saída, sendo estatisticamente significativa para a variável de saída avaliada aqui. Todavia a variável quadrática X_2^2 apresenta efeito negativo, ou seja, não é estatisticamente significativo para o rendimento na extração.

A pesquisa da ANOVA (Tabela 11), para a variável de resposta RD, foi avaliada com base no valor de “p”, o qual indica a probabilidade de cada variável de entrada possuir ou não significância para variáveis de resposta e comprovou que a variável X_1 (temperatura), X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_2^2 e a variável combinada (X_1X_2) , apresentaram um efeito estatisticamente significativo em um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$), onde ela mostra uma menor probabilidade de estar na região de hipótese nula (não apresentando significância estatística para a resposta). Porém a variável linear X_3^2 e as combinadas X_1X_3 e X_2X_3 não apresentaram significância estatística para rendimento.

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Rendimento

FATOR DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F	P
X_1	5,07	1	5,07	418,03	0,002384
X_1^2	0,85	1	0,85	69,99	0,013988
X_2	9,48	1	9,48	781,57	0,001277
X_2^2	4,39	1	4,39	361,83	0,002752
X_3	3,41	1	3,41	280,72	0,003543
X_3^2	0,01	1	0,01	0,99	0,424273
X_1X_2	1,30	1	1,29	106,17	0,009288
X_1X_3	0,01	1	0,01	1,00	0,423179
X_2X_3	0,00	1	0,00	0,01	0,935938
Falta de ajuste	0,37	3	0,12	10,05	0,091833
Erro Puro	0,02	2	0,01		
Total SQ	25,26	14			

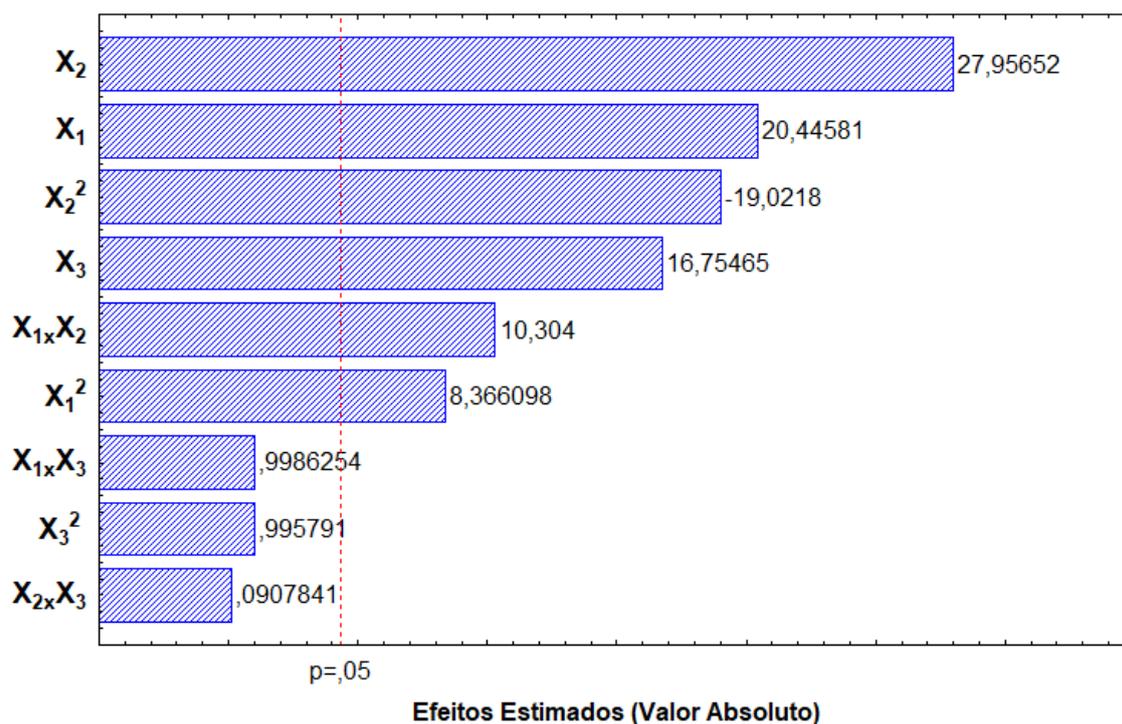
$R^2 = 98,46\%$

SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; F= N° de Fisher; p= Análise de probabilidade; X_1 = Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

Ademais, a análise da ANOVA mostra que os efeitos das variáveis de entrada sobre a resposta na forma linear, quadrática e com termos cruzados, podem ser avaliados com base no valor de p, que indica a probabilidade que cada variável possui de não ser considerada significativa para cada variável, ou seja, estar dentro da região de hipótese nula. Ou avaliando o valor de F calculado ($F_{0,5; 3, 2} = 25,26$) tem que ser maior que o valor F crítico ($F_{0,5; 3, 2} = 19,16$, conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978), para indicar que não há falta de ajuste para o modelo proposto. Neste caso, não há falta de ajuste.

A Figura 21 (Gráfico de Pareto) mostra os efeitos individuais e combinados em relação à variável resposta, além disso, descreve os efeitos estimados padronizados (razão entre os efeitos estimados e o desvio padrão correspondente) que cada variável exerce na resposta. O limite de rejeição da hipótese nula ($p = 0,05$) é mostrado pela linha vertical, para a avaliação da resposta, em que os efeitos localizados a direita desta linha apresentam influência estatística sobre a variável de resposta. O gráfico confirma que as variáveis isoladas X_1 (temperatura), X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_2^2 e as combinadas (X_1X_2) foram significativas no nível de 95% do limite de confiança uma vez que essa variável é encontrada à direita da reta do limite de rejeição da hipótese nula.

Figura 21. Gráfico de pareto para a resposta Rendimento



X_1 =Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

A variável X_2^2 com valor absoluto de -19,0218, apesar de ser significativo, gera também um efeito negativo na variável de saída RD, portanto gera uma redução do rendimento no processo.

Com base nas variáveis influentes, observada na análise estatística realizada anteriormente, é proposto um modelo estatístico para a variável de resposta rendimento, descrito pela Equação 12, em função das variáveis codificadas que apresentam alguma significância para o ajuste proposto, segundo os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 12.

$$RD = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (12)$$

Tabela 12. Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rendimento

PARÂMETROS	COEFICIENTES DE REGRESSÃO
Média	7,27
X_1	0,80
X_1^2	-0,48
X_2	1,09
X_2^2	1,09
X_3	0,65
X_3^2	-0,06
(X_1X_2)	0,57
(X_1X_3)	0,01
(X_2X_3)	0,01

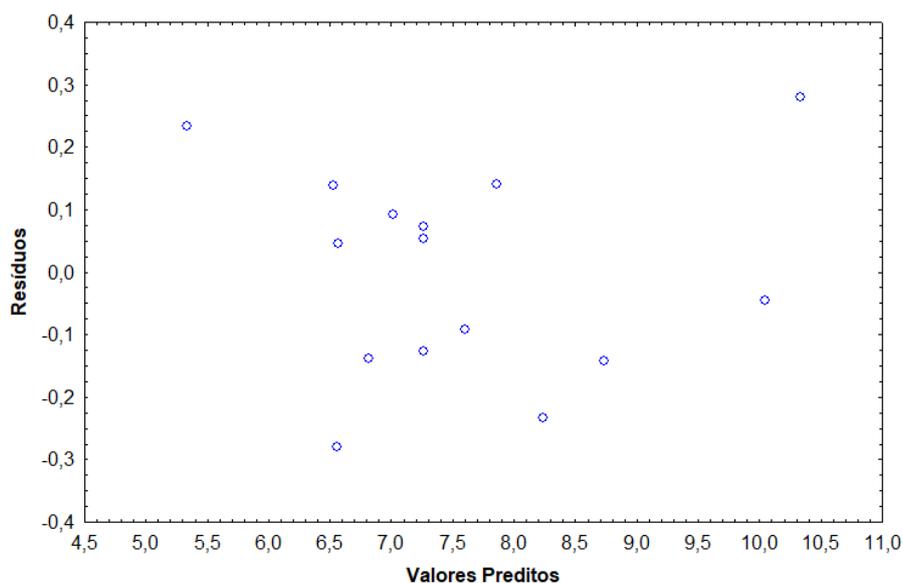
X_1 = Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

Considerando os coeficientes de regressão significativos, gera-se um modelo polinomial para a variável de resposta rendimento representada pela Equação 13.

$$RD = 7,27 + 0,80X_1 + 1,09X_2 + 0,65X_3 - 0,48X_1^2 + 1,09X_2^2 + 0,57X_1X_2 \quad (13)$$

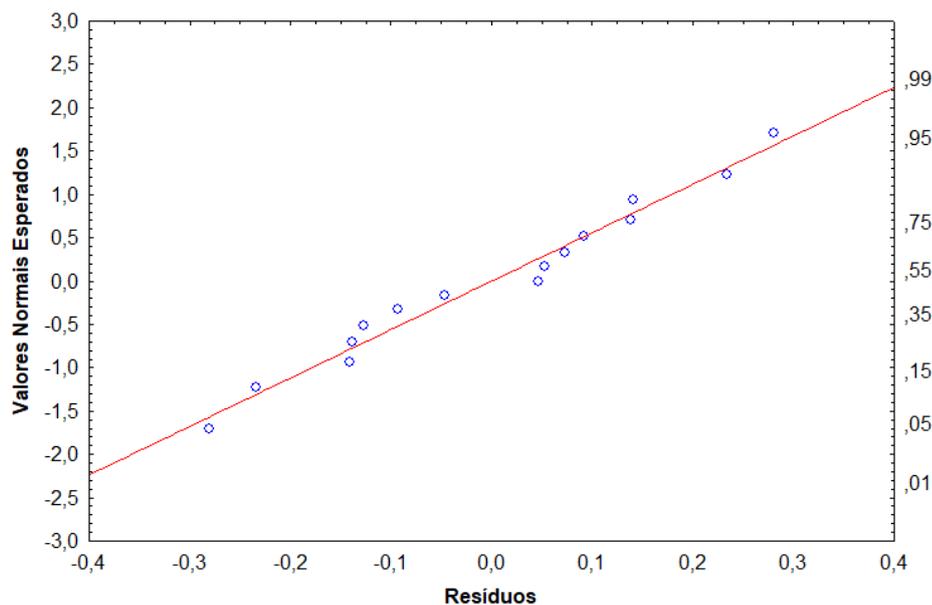
A análise de resíduos avalia a amplitude dos resíduos em torno do zero, bem como representa a distribuição de resíduos em função dos valores preditos pelo modelo proposto, ou seja, esta análise designa que a distribuição dos resíduos tem de ser aleatória, não apresentando comportamento sistemático ou tendencioso, o que indica a independência das variáveis de entrada. Caso isso ocorra, admite-se que o modelo matemático descreve bem a equação proposta (Figura 22).

Figura 22. Gráfico da Distribuição dos resíduos para o Rendimento



A distribuição de probabilidade normal dos resíduos é uma distribuição onde os pontos terão de estar devidamente centralizados ou muito próximos da reta que intercepta o gráfico. Na Figura 23 verifica-se que o modelo proposto gerou resíduos baixos e é possível comprovar que a análise está de forma coerente com a hipótese estatística, o qual deve ser obedecido para que modelo de regressão apresente precisão nos valores de RD. No gráfico de normalidade é possível verificar que os pontos experimentais estão dentro da curva, que está representada pela linha vermelha.

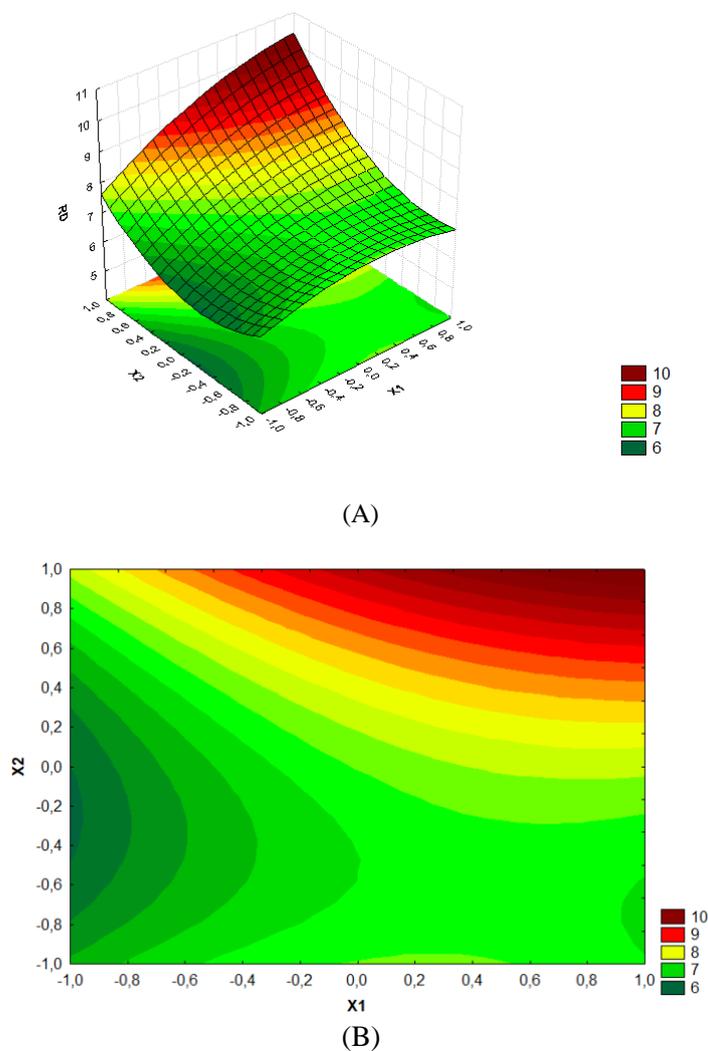
Figura 23. Gráfico do Teste de Normalidade para Rendimento



Com o objetivo de visualização do ponto ótimo de operação, construíram-se gráficos de superfícies de resposta e suas correspondentes curvas de níveis ou contornos em função das variáveis codificadas. Grafou-se no eixo z a variável de saída rendimento (RD), e nos eixos x e y duas variáveis de interesse, mantendo-se a outra no ponto estacionário, como ilustrado na Figura 24 (A) e (B).

Desse modo, sabendo-se que as variáveis X_2 (granulometria) e X_1 (temperatura) possuíram os maiores valores matemáticos significativos para a resposta rendimento, de acordo com a Figura 20 (Gráfico de Pareto), a construção da superfície de resposta e os contornos será em função de X_2 e X_1 , mantendo-se X_3 (relação massa/solvente) fixo no ponto 0 ($X_3 = 0$).

Figura 24. (A) Gráfico da Superfície de Resposta e (B) Curva de Nível para Rendimento



Nas Figuras 24 (A) e (B), é possível observar que as condições que favorecem altos rendimentos são +1 para a variável X_1 (temperatura) e +1 para a variável X_2 (granulometria), em outras palavras, temperatura = 60 °C e granulometria = 1,700 mm.

5.2.2 Quantificação de Polifenóis Totais

A Tabela 13 contém os valores da quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos. Os valores foram calculados a partir da equação de regressão $y = 19,84x + 0,02$, com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9993, o qual foi obtido pela curva analítica do ácido gálico (y é a absorbância a 750 nm e x é a concentração em mg de ácido gálico em g de extrato).

Os valores máximos e mínimos foram os dos ensaios 3 (temperatura = 30°C; granulometria= 1,700 mm; relação massa/solvente: 1:5 g/mL) e 12 (temperatura = 60°C; granulometria= 0,913 mm; relação massa/solvente: 1:4g/mL), os quais forneceram 308,84 e 101,33 mg EAG/g de amostra, respectivamente. A concentração elevada nos extratos mostra que a biossíntese dos compostos bioativos é acelerada pela exposição aos raios ultravioleta e promovem a proteção da planta contra esses raios emitidos pelo sol (HARBONE e WILLIAMS, 2000). Para o estudo de SILVA (2019), os valores máximo e mínimo foram os dos ensaios 2 (T = 60 °C e G = 0,12mm e M/V= 1:5) e 3 (T = 40 °C e G = 0,53 mm), os quais forneceram 58,47 e 23,34 mg EAG/g de amostra, respectivamente.

Tabela 13. Matriz experimental para a variável de resposta Polifenóis Totais

ENSAIOS	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS REAIS			PT (mg EAG/g)
	X ₁	X ₂	X ₃	T (°C)	G (mm)	S/L (g/mL)	
1	-1	-1	0	30	0,094	1:5	195,84
2	1	-1	0	60	0,094	1:5	290,24
3	-1	1	0	30	1,700	1:5	308,84
4	1	1	0	60	1,700	1:5	237,58
5	-1	0	-1	30	0,913	1:4	158,18
6	1	0	-1	60	0,913	1:4	101,33
7	-1	0	1	30	0,913	1:6	156,24
8	1	0	1	60	0,913	1:6	213,85
9	0	-1	-1	45	0,094	1:4	147,28
10	0	1	-1	45	1,700	1:6	117,60
11	0	-1	1	45	0,094	1:4	123,15
12	0	1	1	45	1,700	1:6	245,44
13	0	0	0	45	0,913	1:5	177,79
14	0	0	0	45	0,913	1:5	177,07
15	0	0	0	45	0,913	1:5	180,80

T= Temperatura; G= Granulometria; S/L =sólido/líquido; PT= Polifenóis Totais; EAG= Equivalente Ácido Gálico; mm= milímetro; mg= miligrama; g= grama; °C= Graus Celsius; g/mL= grama/mililitro.

5.2.2.1 Análise estatística da variável de resposta Polifenóis Totais (PT)

Na análise da variância (Statistica® 7.0) para a variável de resposta (PT), obteve-se um valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9960 ou 99,60%.

Os resultados adquiridos dos efeitos dos parâmetros estão apresentados na Tabela 14, o qual nos informa que as variáveis isoladas X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 e as variáveis combinadas X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 são estatisticamente significativa para a variável de resposta rendimento, uma vez que seus efeitos são maiores quando comparados aos desvios, confirmando que esses efeitos não ocorrem somente devido aos erros experimentais.

Tabela 14. Efeitos Estimados para Polifenóis Totais

FATOR	EFEITOS	ERRO PADRÃO
Média	191,30	±0,57
X_1	5,98	±1,40
X_1^2	-39,30	±1,03
X_2	38,23	±1,40
X_2^2	-40,27	±1,03
X_3	53,57	±1,40
X_3^2	60,46	±1,03
(X_1X_2)	-82,83	±1,98
(X_1X_3)	57,23	±1,98
(X_2X_3)	75,99	±1,98

X_1 =Temperatura; X_2 =tempo; X_3 =Relação massa/solvente.

As variáveis X_2 , X_3 , X_3^2 , X_1X_3 e X_2X_3 geram um efeito positivo na variável de saída, sendo estatisticamente significativa para a variável polifenóis totais. Todavia a as variáveis X_1^2 , X_2^2 e X_1X_2 apresentam efeito negativo, ou seja, não são estatisticamente significativos para a obtenção de uma quantidade de polifenóis totais considerável na extração.

A pesquisa da ANOVA (Tabela 15), para a variável de resposta PT, foi avaliada com base no valor de “p” e comprovou que as variáveis X_1 (temperatura), X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 e as variáveis combinadas X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 , apresentaram um efeito estatisticamente significativo em um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Porém a variável linear X_1 não apresentou significância estatística para polifenóis totais.

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Polifenóis Totais

FATOR DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F	P
X_1	71,40	1	71,40	18,24	0,050700
X_1^2	5703,34	1	5703,34	1456,70	0,000686
X_2	2924,21	1	2924,21	746,88	0,001336
X_2^2	5987,59	1	5987,59	1529,31	0,000653
X_3	5740,03	1	5740,03	1466,07	0,000681
X_3^2	13494,86	1	13494,86	3446,76	0,000290
X_1X_2	6860,81	1	6860,81	1752,34	0,000570
X_1X_3	3275,27	1	3275,27	836,55	0,001193
X_2X_3	5773,72	1	5773,72	1474,68	0,000677
Falta de ajuste	198,68	3	66,23	16,91	0,056335
Erro Puro	7,83	2	3,92		
Total SQ	52039,10	14			

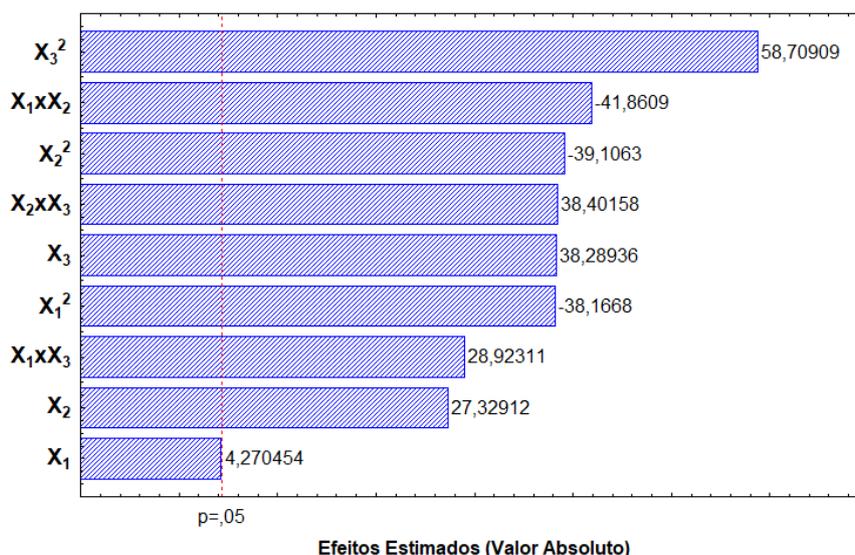
$R^2 = 99,60\%$

SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; F= N° de Fisher; p= Análise de probabilidade; X_1 = Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

O valor de F calculado ($F_{0,5; 3, 2}$) = 52.039,10 tem que ser maior que o valor F crítico ($F_{0,5; 3,2}$) = 19,16, conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978), para indicar que não há falta de ajuste para o modelo proposto. Neste caso, não há falta de ajuste.

A Figura 25 (Gráfico de Pareto) confirma que as variáveis isoladas X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 e as variáveis combinadas X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 foram significativas no nível de 95% do limite de confiança uma vez que essa variável é encontrada à direita da reta do limite de rejeição da hipótese nula.

Figura 25. Gráfico de pareto para a resposta Polifenóis Totais



X_1 =Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

A variável X_1X_2 , X_2^2 , X_1^2 apresentam valores de -41,8609, -39,1063 e -38,1668 respectivamente. Apesar de serem significativos, geram também um efeito negativo na variável de saída PT, portanto produz uma redução dos polifenóis totais no processo.

Com base nas variáveis influentes, observada na análise estatística realizada anteriormente, é proposto um modelo estatístico para a variável de resposta polifenóis totais, descrito pela Equação 14, em função das variáveis codificadas que apresentam alguma significância para o ajuste proposto, segundo os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 16.

$$PT = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_1X_1^2 + \beta_2X_2^2 + \beta_3X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 \quad (14)$$

Tabela 16. Coeficientes de regressão para a variável de resposta Polifenóis Totais

PARÂMETROS	COEFICIENTES DE REGRESSÃO
Média	178,55
X_1	2,99
X_1^2	39,30
X_2	19,12
X_2^2	40,27
X_3	26,79
X_3^2	-60,46
(X_1X_2)	-41,42
(X_1X_3)	28,62
(X_2X_3)	38,00

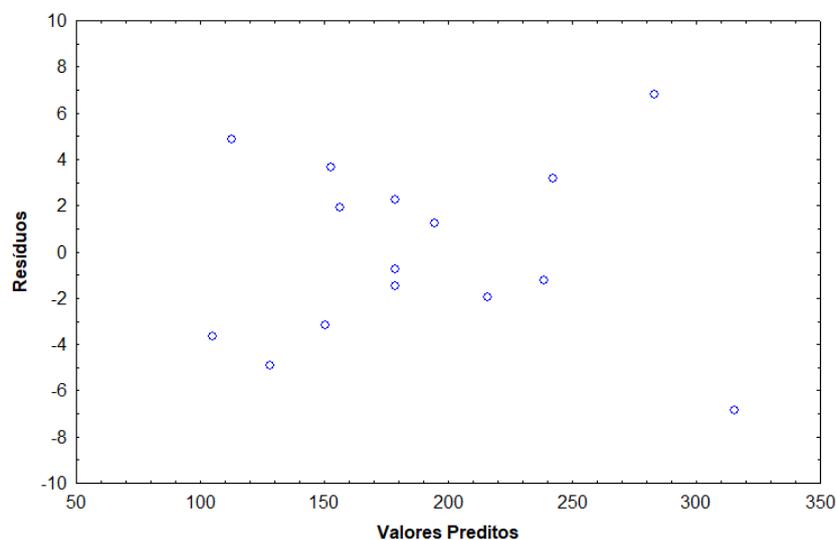
X_1 = Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

Considerando os coeficientes de regressão significativos, gera-se um modelo polinomial para a variável de resposta rendimento representada pela Equação 15.

$$PT = 178,55 + 19,12X_2 + 26,79X_3 + 39,30X_1^2 + 40,27X_2^2 - 60,46X_3^2 - 41,42X_1X_2 + 28,62X_1X_3 + 38,00X_2X_3 \quad (15)$$

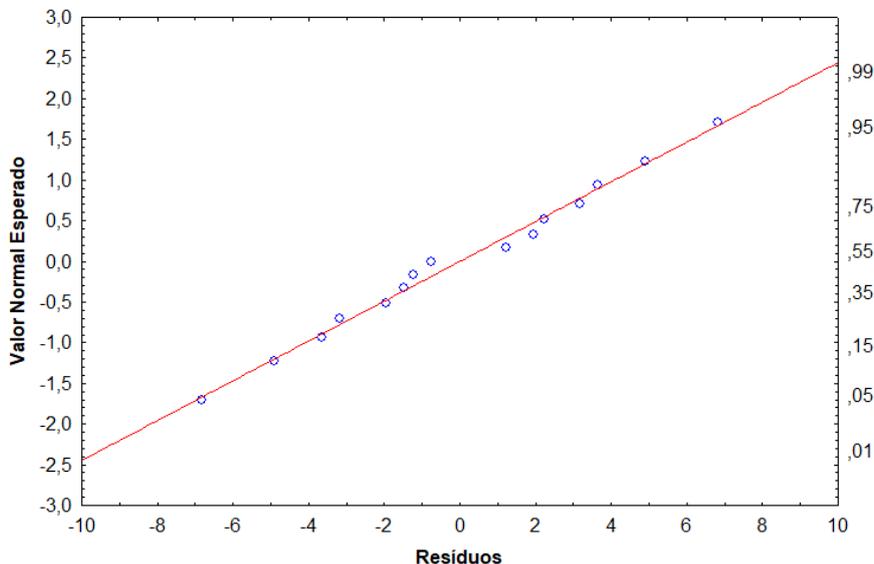
A Figura 26 mostra o gráfico de resíduos onde pode-se admitir que que o modelo matemático descreve bem a equação proposta.

Figura 26. Gráfico da Distribuição dos resíduos para Polifenóis Totais



No gráfico de normalidade (Figura 27) é possível verificar que os pontos experimentais estão dentro da curva, que está representada pela linha vermelha.

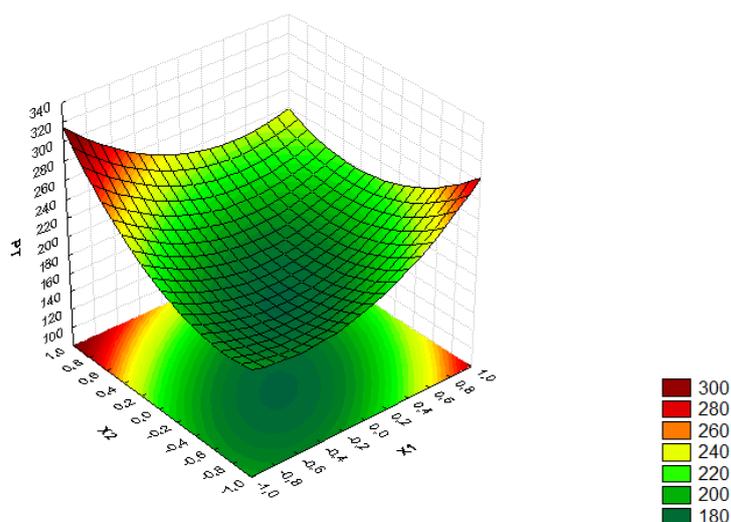
Figura 27. Gráfico do Teste de Normalidade para Polifenóis Totais



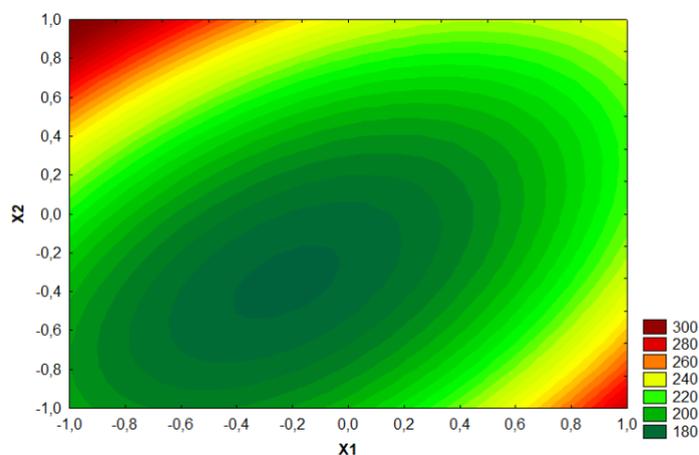
Com o objetivo de visualização do ponto ótimo de operação, construíram-se gráficos de superfícies de resposta e suas correspondentes curvas de níveis ou contornos em função das variáveis codificadas. Grafou-se no eixo z a variável de saída polifenóis totais (PT), e nos eixos x e y duas variáveis de interesse, mantendo-se a outra no ponto estacionário, como ilustrado na Figura 28 (A) e (B).

A construção da superfície de resposta e os contornos será em função de X_1 e X_2 , mantendo-se X_3 (temperatura) fixo no ponto 0 ($X_3 = 0$).

Figura 28. (A) Gráfico da Superfície de Resposta e (B) Curva de Nível para Polifenóis Totais



(A)



(B)

Nas Figuras 28 (A) e (B), é possível observar que as condições que favorecem altos rendimentos são -1 para a variável X_1 (temperatura) e $+1$ para a variável X_2 (granulometria), em outras palavras, temperatura = $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e granulometria = $1,700\text{ mm}$.

5.2.3 Análise de Atividade Antioxidante

A Tabela 17 mostra a atividade antioxidante determinada pelo ensaio de DPPH, onde os resultados foram expressos em IC_{50} e variaram de $94,74\%$ (ensaio 14) à $98,97\%$ (ensaio 8). As variáveis de entrada influenciaram bastante nos valores obtidos, além da composição química dos ensaios, especialmente com relação aos compostos fenólicos, o que tornou diferentes os valores das corridas que apresentavam condições físicas distintas na extração.

Em comparação ao trabalho de SILVA (2019) os valores expressos em IC₅₀ variaram de 97,45% (corrida 2; T = 60 °C e G = 0,12mm e M/V= 1:5) à 89,16% (ensaio 7; T = 40 °C e G = 0,37mm e M/V= 1:6). Ou seja, pode-se observar que a atividade antioxidante do material botânico aqui estudado é elevada.

Tabela 17. Matriz experimental para a variável de resposta Atividade Antioxidante

ENSAIOS	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS REAIS			AA (IC ₅₀)
	X ₁	X ₂	X ₃	T (°C)	G (mm)	S/L (g/mL)	
1	-1	-1	0	30	0,094	1:5	95,05
2	1	-1	0	60	0,094	1:5	96,05
3	-1	1	0	30	1,700	1:5	95,30
4	1	1	0	60	1,700	1:5	98,59
5	-1	0	-1	30	0,913	1:4	95,50
6	1	0	-1	60	0,913	1:4	98,49
7	-1	0	1	30	0,913	1:6	97,35
8	1	0	1	60	0,913	1:6	98,97
9	0	-1	-1	45	0,094	1:4	95,19
10	0	1	-1	45	1,700	1:6	96,64
11	0	-1	1	45	0,094	1:4	96,45
12	0	1	1	45	1,700	1:6	96,78
13	0	0	0	45	0,913	1:5	94,91
14	0	0	0	45	0,913	1:5	94,74
15	0	0	0	45	0,913	1:5	94,76

T= Temperatura; G= Granulometria; S/L =sólido/líquido; AA= Atividade Antioxidante; IC₅₀= Concentração mínima responsável por diminuir o DPPH em 50 %; mm= milímetro; °C= Graus Celsius; g/mL= grama/mililitro.

5.2.3.1 Análise estatística da variável antioxidante (AA)

Na análise da variância (Statistica® 7.0) para a variável de resposta (AA), obteve-se um valor de coeficiente de determinação (R²) de 0,9911 ou 99,11%.

Os resultados adquiridos dos efeitos dos parâmetros estão apresentados na Tabela 18, qual nos informa que as variáveis isoladas X_1 (temperatura), X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_3^2 e as variáveis combinadas X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 são estatisticamente significativa para a variável de resposta rendimento, uma vez que seus efeitos são maiores quando comparados aos desvios, confirmando que esses efeitos não ocorrem somente devido aos erros experimentais.

Tabela 18. Efeitos Estimados para Atividade Antioxidante

FATOR	EFEITOS	ERRO PADRÃO
Média	96,70	±0,03
X_1	2,23	±0,07
X_1^2	-1,38	±0,05
X_2	1,14	±0,07
X_2^2	-0,07	±0,05*
X_3	0,93	±0,07
X_3^2	-1,40	±0,05
(X_1X_2)	1,15	±0,09
(X_1X_3)	-0,69	±0,09
(X_2X_3)	-0,56	±0,09

X_1 =Temperatura; X_2 =tempo; X_3 =Relação massa/solvente.

*p= 0,306457, logo X_2^2 não foi influente no processo

As variáveis X_1 , X_2 , X_3 e X_1X_2 geram um efeito positivo na variável de saída, sendo estatisticamente significativa para a variável atividade antioxidante. Todavia as variáveis X_1^2 , X_3^2 , X_1X_3 e X_2X_3 apresentam efeito negativo, ou seja, não são estatisticamente significativos para o rendimento na extração.

A pesquisa da ANOVA (Tabela 19), para a variável de resposta AA, comprovou que as variáveis X_1 (temperatura), X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_3^2 e as variáveis combinadas X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 , apresentaram um efeito estatisticamente significativo em um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Porém a variável quadrática X_2^2 não apresentou significância estatística para atividade antioxidante.

Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta Atividade Antioxidante

FATOR DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F	P
X_1	9,90	1	9,90	1146,86	0,000871
X_1^2	7,01	1	7,01	812,51	0,001228
X_2	2,61	1	2,61	302,39	0,003291
X_2^2	0,02	1	0,02	1,85	0,306457
X_3	1,74	1	1,74	201,44	0,004928
X_3^2	7,19	1	7,19	833,27	0,001198
X_1X_2	1,31	1	1,31	151,86	0,006521
X_1X_3	0,47	1	0,47	54,35	0,017906
X_2X_3	0,31	1	0,31	36,32	0,026443
Falta de ajuste	0,25	3	0,08	9,59	0,095880
Erro Puro	0,02	2	0,01		
Total SQ	29,87	14			

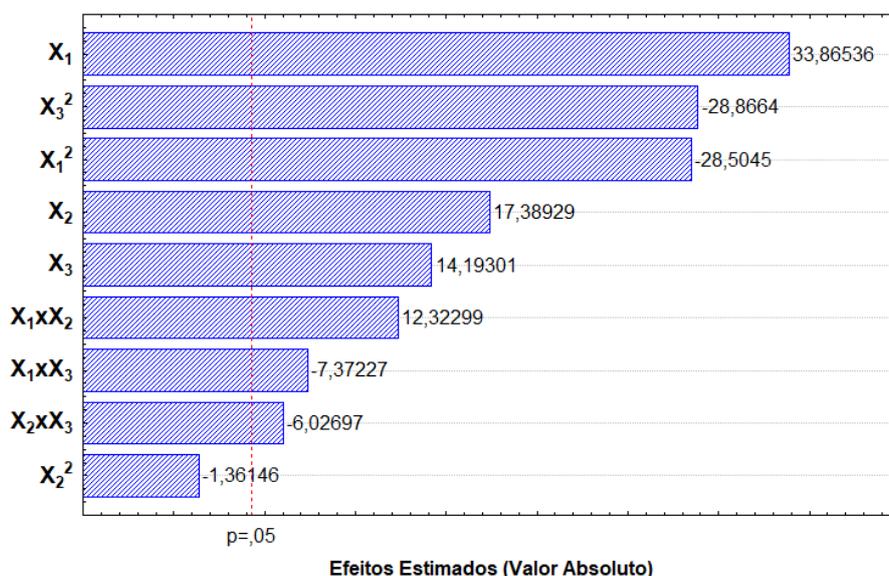
$R^2 = 99,60\%$

SQ= Soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; F= N° de Fisher; p= Análise de probabilidade; X_1 = Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

O valor de F calculado ($F_{0,5; 3, 2}$) = 29,87 que tem que ser maior que o valor F crítico ($F_{0,5; 3,2}$) = 19,16, conforme valor tabelado em Box, Hunter e Hunter (1978), para indicar que não há falta de ajuste para o modelo proposto. Neste caso, não há falta de ajuste.

A Figura 29 (Gráfico de Pareto) mostra que as variáveis isoladas X_1 (temperatura), X_2 (granulometria), X_3 (relação massa/solvente), as quadráticas X_1^2 , X_3^2 e as variáveis combinadas X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 foram significativas no nível de 95% do limite de confiança uma vez que essa variável é encontrada à direita da reta do limite de rejeição da hipótese nula.

Figura 29. Gráfico de pareto para a resposta atividade antioxidante



X_1 =Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

As variáveis X_3^2 , X_1^2 , X_1X_3 e X_2X_3 apresentam valores de -28,8664, -28,5045, -7,37227 e -6,02697 respectivamente. Apesar de serem significativos, geram também um efeito negativo na variável de saída AA, portanto produz uma redução dos atividade antioxidante no processo.

Com base nas variáveis influentes, observada na análise estatística realizada anteriormente, é proposto um modelo estatístico para a variável de resposta atividade antioxidante, descrito pela Equação 16, em função das variáveis codificadas que apresentam alguma significância para o ajuste proposto, segundo os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 20.

$$AA = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_1X_1^2 + \beta_2X_2^2 + \beta_3X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 \quad (16)$$

Tabela 20. Coeficientes de regressão para a variável de resposta Atividade Antioxidante

PARÂMETROS	COEFICIENTES DE REGRESSÃO
Média	94,80
X_1	1,11
X_1^2	1,38
X_2	0,57
X_2^2	0,07
X_3	0,47
X_3^2	1,40
(X_1X_2)	0,57
(X_1X_3)	-0,34
(X_2X_3)	-0,28

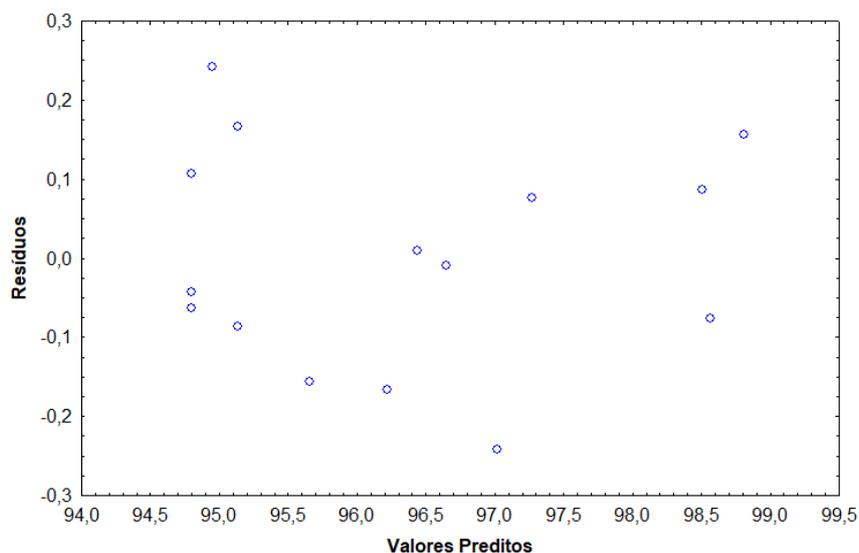
X_1 = Temperatura; X_2 = Granulometria; X_3 = Relação massa/solvente.

Considerando os coeficientes de regressão significativos, gera-se um modelo polinomial para a variável de resposta rendimento representada pela Equação 17.

$$AA = 94,80 + 1,11X_1 + 0,57X_2 + 0,47X_3 + 1,38X_1^2 + 1,40X_3^2 + 0,57X_1X_2 - 0,34X_1X_3 - 0,28X_2X_3 \quad (17)$$

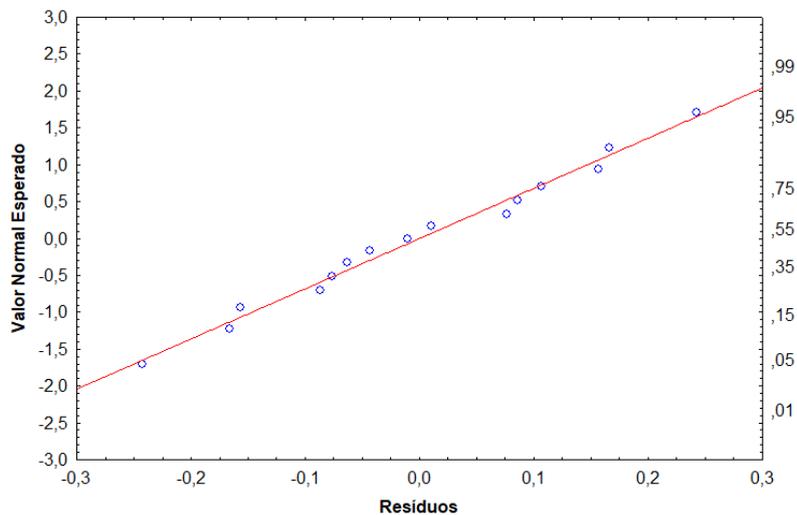
A Figura 30 mostra o gráfico de resíduos onde pode-se admitir que que o modelo matemático descreve bem a equação proposta.

Figura 30. Gráfico da Distribuição dos resíduos para Atividade Antioxidante



No gráfico de normalidade (Figura 31) é possível verificar que os pontos experimentais estão dentro da curva, que está representada pela linha vermelha.

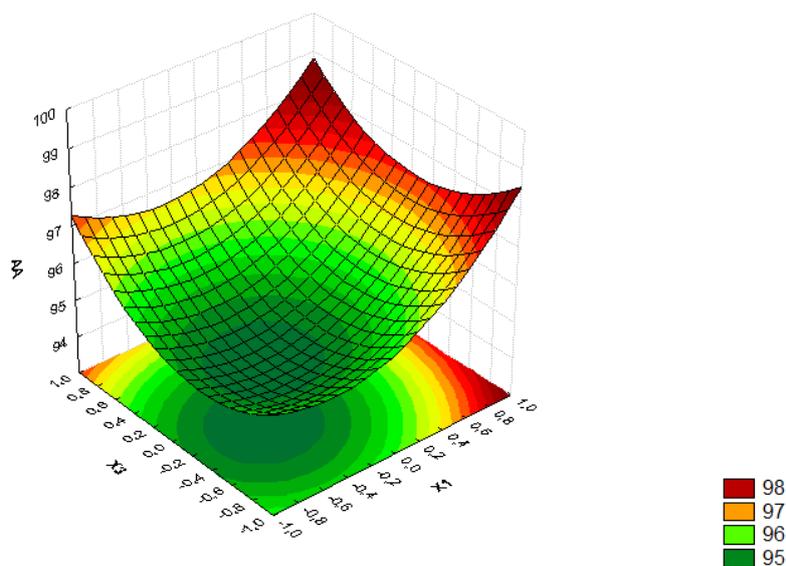
Figura 31. Gráfico do Teste de Normalidade para Atividade Antioxidante



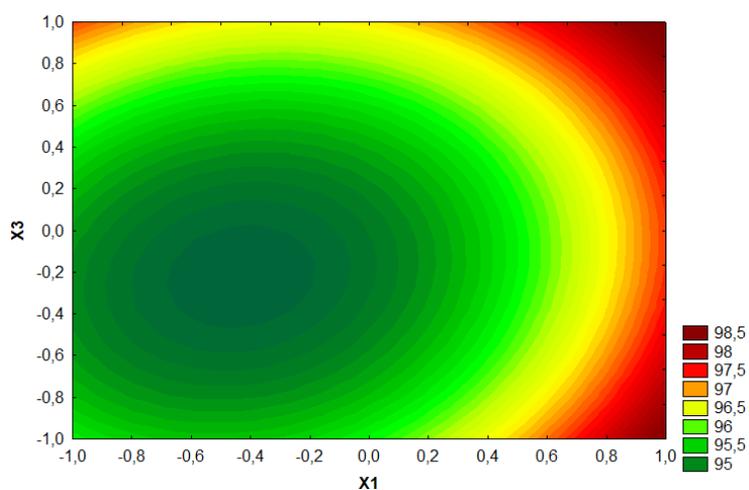
Com o objetivo de visualização do ponto ótimo de operação, construíram-se gráficos de superfícies de resposta e suas correspondentes curvas de níveis ou contornos em função das variáveis codificadas. Grafou-se no eixo z a variável de saída atividade antioxidante (AA), e nos eixos x e y duas variáveis de interesse, mantendo-se a outra no ponto estacionário, como ilustrado na Figura 32 (A) e (B).

A construção da superfície de resposta e os contornos será em função de X_1 e X_3 , mantendo-se X_2 (temperatura) fixo no ponto 0 ($X_2 = 0$).

Figura 32. (A) Gráfico da Superfície de Resposta e (B) Curva de Nível para Atividade Antioxidante



(A)



(B)

Nas Figuras 32 (A) e (B), é possível observar que as condições que favorecem alta atividade antioxidante são +1 para a variável X_1 (temperatura) e +1 para a variável X_3 (relação massa/solvente), em outras palavras, temperatura= 60 °C e relação massa/solvente= 1:6 g/mL.

5.2.4 Função Desejabilidade

Para a otimização do processo extrativo diante das variáveis X_1 , X_2 e X_3 foi aplicada a técnica de otimização simultânea “Função Desejabilidade” (DERRINGER; SUICH, 1980; AKHANAZAROVA e KAFAROV, 1982).

De acordo com isso, a função desejabilidade especifica os níveis de cada uma das variáveis de entrada X_1 (temperatura), X_2 (granulometria) e X_3 (relação massa/solvente), na qual permitem a maximização das variáveis de saída rendimento (Rd, %), quantificação dos polifenóis totais (PT, EGA/g) e da atividade antioxidante (AA, %IC₅₀) dos extratos obtidos na extração com extrator de aço-inox.

Na Tabela 21 observa-se os valores atribuídos para a otimização do processo extrativo (Statistica® 7.0). Para isso foram empregados os valores numéricos para o limite inferior (LI), valor mediano (M) e limite superior (LS), bem como, os valores dos expoentes s e t . Esses valores indicam a importância da função para encontrar o valor médio desejado. O valor 0 significa que o valor é indesejado, 0,5 moderadamente desejado e 1 muito desejado.

Tabela 21. Parâmetros utilizados na otimização das respostas Rendimento, Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante

RESPOSTAS	LI	M	LS	s	t
RD	5,57 (0)	8,09 (0,5)	10,61 (1)	3	3
CF	101,33 (0)	205,09 (0,5)	308,84 (1)	3	3
AA	94,74 (0)	96,86 (0,5)	98,97 (1)	3	3

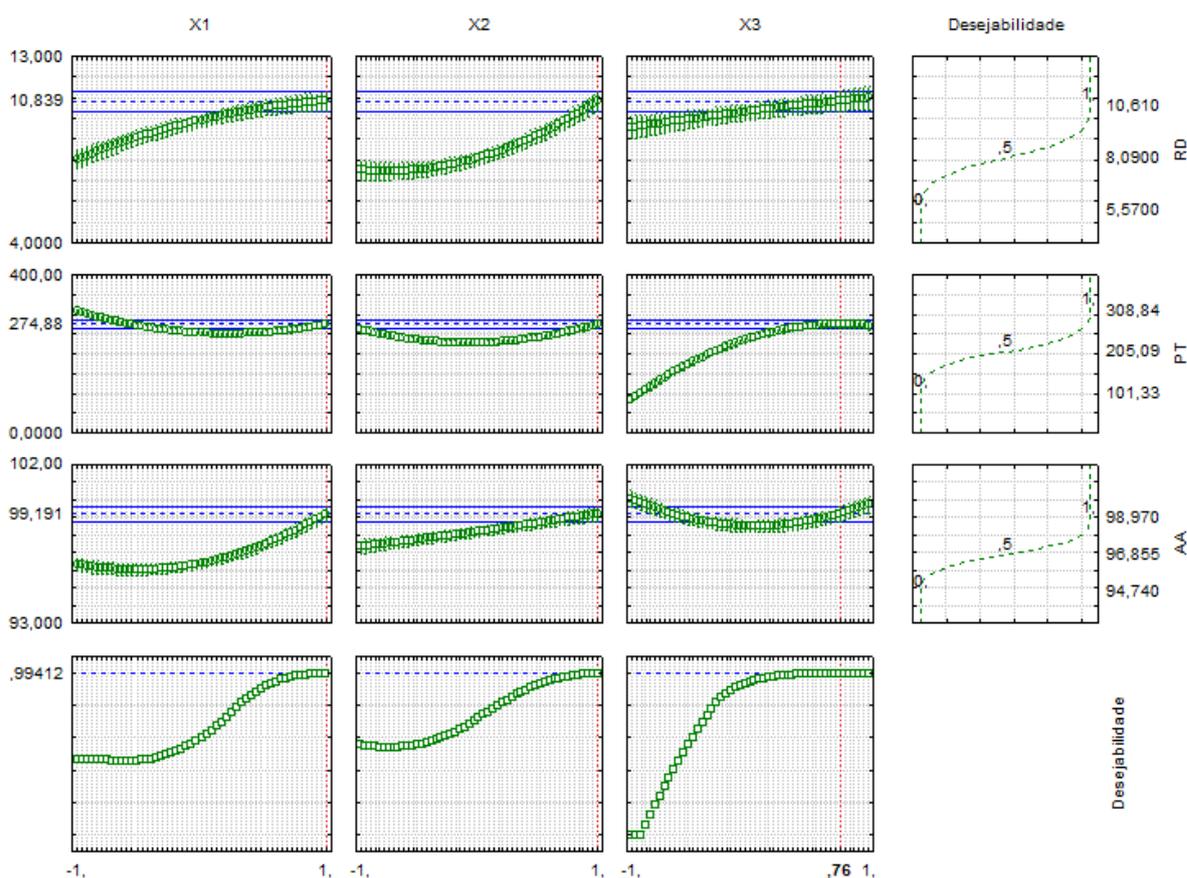
RD= Rendimento; CF= Compostos Fenólicos; AA= Atividade Antioxidante; L= Limite Inferior; M= Mediana; LS= Limite Superior.

O diagrama da Função Desejabilidade, mostrado na Figura 33 usando os coeficientes $s = 3$ e $t = 3$ e fator de grade igual a 50, apresentou um coeficiente de desejabilidade global (D) 0,9941 ou 99,41%, o qual é considerada uma resposta aceitável e excelente. Ademais, considerado o valor de desejabilidade 1, acima de 10% para a variável de resposta rendimento, acima de 300%, para a variável de resposta polifenóis totais e acima de 98% para a variável de saída atividade antioxidante. Os níveis das variáveis X_1 , X_2 , e X_3 que otimizam as respostas são mostrados através das linhas em

vermelho o que corresponde à 1, 1 e 0,76 respectivamente, ou seja, temperatura de 60°C, granulometria de 1,70 mm e relação massa/solvente próximo de 1:6.

Os valores ótimos para as variáveis de resposta são mostrados através das linhas tracejadas horizontais em azul, onde mostram que o valor ótimo para rendimento seria de **10,84%**, já para a variável de resposta polifenóis totais de **274,88%** e para a atividade antioxidante de **99,19%**.

Figura 33. Perfis de função desejabilidade para as respostas Rendimento, Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante



Na Tabela 22 são mostradas as variáveis de entrada codificadas e reais, bem como seus respectivos valores para as variáveis de saída Rendimento, Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante obtidos a partir da extração da casca do caule do *C. pullei*, como mostrado anteriormente.

Tabela 22. Respostas Rendimento, Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante dos extratos obtidos

ENSAIOS	VARIÁVEIS DE ENTRADA CODIFICADAS			VARIÁVEIS DE ENTRADA REAIS (UND)			VARIÁVEIS DE SAÍDA (UND)		
	X ₁	X ₂	X ₃	T (°C)	G (mm)	S/L (g/mL)	RD (%)	PT (mg EAG/g)	AA IC ₅₀ (%)
1	-1	-1	0	30	0,094	1:5	6,28	195,84	95,05
2	1	-1	0	60	0,094	1:5	7,11	290,24	96,05
3	-1	1	0	30	1,700	1:5	7,51	308,84	95,30
4	1	1	0	60	1,700	1:5	10,61	237,58	98,59
5	-1	0	-1	30	0,913	1:4	5,57	158,18	95,50
6	1	0	-1	60	0,913	1:4	6,68	101,33	98,49
7	-1	0	1	30	0,913	1:6	6,67	156,24	97,35
8	1	0	1	60	0,913	1:6	8,00	213,85	98,97
9	0	-1	-1	45	0,094	1:4	6,61	147,28	95,19
10	0	1	-1	45	1,700	1:4	8,59	117,60	96,64
11	0	-1	1	45	0,094	1:6	8,00	123,15	96,45
12	0	1	1	45	1,700	1:6	10,00	245,44	96,78
13	0	0	0	45	0,913	1:5	7,14	177,79	94,91
14	0	0	0	45	0,913	1:5	7,34	177,07	94,74
15	0	0	0	45	0,913	1:5	7,32	180,80	94,76

T= temperatura; G= granulometria; °C= graus Celsius; mm= milímetro; RD= rendimento da extração; PT= Polifenóis Totais; AA= Atividade Antioxidante; %= Porcentagem; µg/mL= micrograma por mililitro; mg EAG/g= miligrama de Equivalentograma de Ácido Gálico por grama de amostra

5.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As Tabelas 23 e 24 apresentam a proximidade entre os valores teóricos dos deslocamentos químicos usando os métodos B3LYP/6-31 G e B3LYP/cc-pVDZ e os experimentais, bem como os valores residuais (RS) em ppm para cada átomo de carbono e hidrogênio da estrutura julocrotina (Figura 03) para RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Para ambos os métodos, os valores residuais foram baixos, o que afirma que o método computacional utilizado foi eficaz, mostrando que esse método pode ser utilizado para a interpretação de dados experimentais de estruturas semelhantes.

Tabela 23. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^1H RMN (ppm) da julocrotina

Posição	Experimental (ABREU et al., 2001)	B3LYP/6-31 G			B3LYP/CC-PVDZ		
		Em CH_3Cl	Resíduo	Predito	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito
2	4,48	4,34	0,14	4,41	4,01	0,47	4,21
3α	1,68	1,63	0,05	1,64	1,34	0,34	1,51
3β	2,50	2,45	0,05	2,47	2,36	0,14	2,54
4α	2,73	2,58	0,15	2,60	2,46	0,27	2,65
4β	2,80	2,77	0,03	2,80	2,56	0,24	2,75
2'-6'^a	7,25	7,36	0,11	7,50	7,29	0,04	7,53
7'α	2,80	2,60	0,20	2,62	2,45	0,35	2,63
7'β	2,80	2,75	0,05	2,78	2,51	0,29	2,70
8'α	4,0	3,64	0,36	3,70	3,63	0,37	3,83
8'β	4,0	3,81	0,19	3,87	3,76	0,24	3,96
2''	2,21	2,59	0,38	2,62	2,37	0,16	2,56
3''α	1,68	1,70	0,02	1,71	1,57	0,11	1,75
3''β	1,48	1,77	0,29	1,78	1,59	0,11	1,76
4''^a	0,93	0,91	0,02	0,90	0,81	0,12	0,98
5''^a	1,16	1,11	0,05	1,10	1,00	0,16	1,16

^a. Valores médios

Tabela 24. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^{13}C RMN (ppm) da julocrotina

Posição	Experimental	B3LYP/6-31 G			B3LYP/CC-PVDZ		
	(ABREU et al., 2001)	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito
1	171,81	166,44	5,36	174,74	171,75	0,05	173,41
2	51,2	53,05	1,85	53,91	55,47	4,27	53,65
3	24,40	26,19	1,79	25,29	28,18	3,78	25,55
4	31,70	32,47	0,77	31,98	34,04	2,34	31,59
5	170,90	164,30	6,60	172,46	169,19	1,72	170,77
1'	138,10	131,78	6,32	137,81	139,27	1,17	139,96
2'	128,90	122,60	6,30	128,02	127,88	1,02	128,23
3'	128,40	121,90	6,50	127,28	127,85	0,55	128,20
4'	126,60	120,13	6,47	125,40	125,64	0,96	125,92
5'	128,40	122,02	6,38	127,40	127,98	0,42	128,33
6'	128,90	122,86	6,04	128,30	128,24	0,66	128,60
7'	33,90	44,88	10,98	45,21	45,98	12,08	43,88
8'	41,60	36,10	5,50	35,85	38,03	3,57	35,69
1''	176,80	166,80	10,00	175,12	172,71	4,09	174,40
2''	42,90	40,83	2,07	40,90	44,13	1,23	41,98
3''	27,20	29,80	2,60	29,13	32,54	5,34	30,04
4''	11,70	9,80	1,90	7,83	10,46	1,24	7,30
5''	17,20	15,55	1,65	13,95	16,09	1,11	13,10

Nos gráficos de probabilidade de resíduos (Figuras 34 a 37) é importante observar a distribuição dos pontos ao longo do intervalo de valores de atividades analisado, como também o alinhamento dos pontos em relação à reta ajustada. Se houver agrupamento de pontos em determinadas regiões do gráfico e/ou pontos isolados nos extremos do gráfico, é necessário observar com cautela o impacto desses pontos sobre estrutura da equação de regressão. Na Figura 34, dos quinze resíduos estudados, quatorze resíduos se encontram na área delimitada pelas linhas tracejadas, que corresponde à região do gráfico onde existe 95% de probabilidade de passar a verdadeira reta do gráfico. Entretanto um ponto fora da região tracejada encontra-se bem próximo a ela. Já na Figura 35, todos os quinze resíduos se encontram dentro da região. Isso mostra que o gráfico de resíduo para RMN H^1 da julocrotina que fornece melhores resultados é para o método B3LYP/cc-pvDZ.

Figura 34. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da julocrotina com método B3LYP/6-31 G

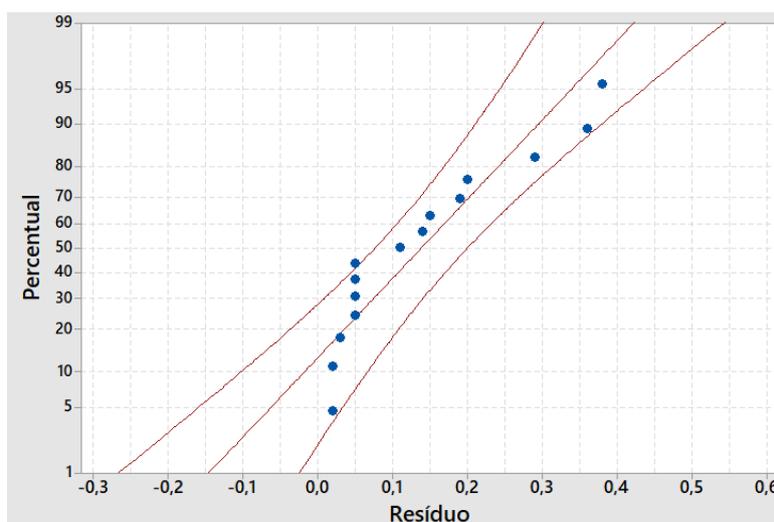
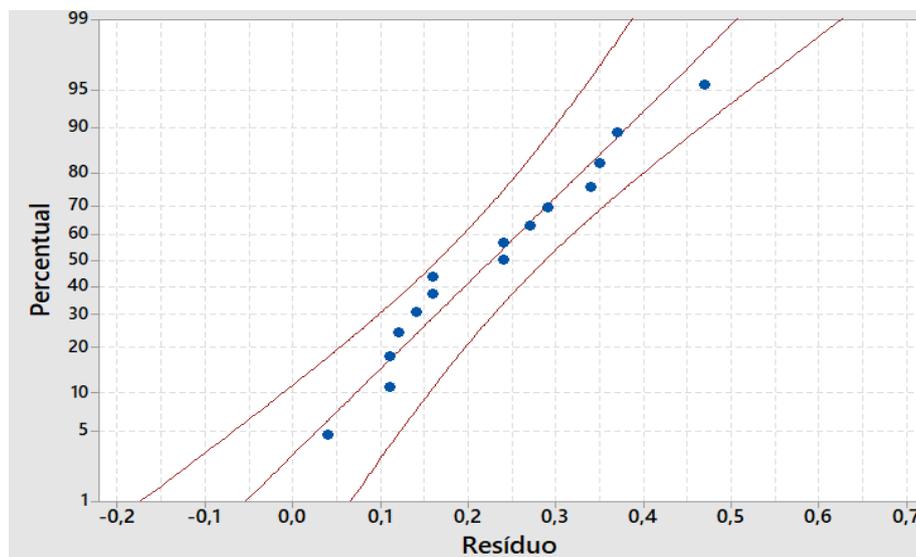


Figura 35. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H¹ da julocrotina com método B3LYP/cc-pvDZ



Na figura 36 observa-se que todos os resíduos avaliados se encontram dentro da região tracejada (região do gráfico onde existe 95% de probabilidade de passar a verdadeira reta do gráfico). Já na figura 37, dos dezoitos resíduos, quinze se encontram dentro da região, dois se encontram próximos a ela e apenas um resíduo apresentou um desvio apreciável. Neste caso o gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C¹³ da julocrotina que gerou melhores resultados foi utilizando o método B3LYP/6-31 G.

Figura 36. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C¹³ da julocrotina com método B3LYP/6-31 G

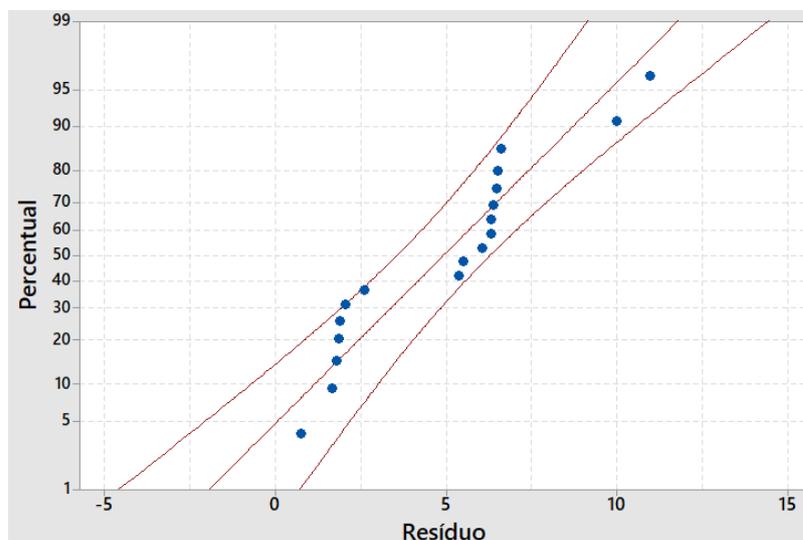
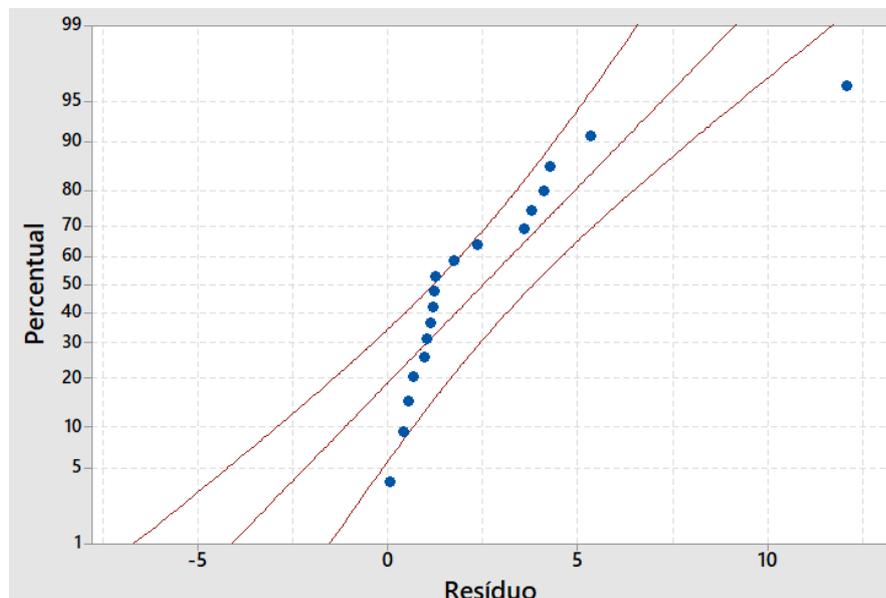


Figura 37. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da julocrotina com método B3LYP/cc-pvDZ



A análise estatística dos dados mostra que os modelos de 1H B3LYP/cc-pVDZ (Figura 38), 1H B3LYP/6-31 G (Figura 39), ^{13}C B3LYP/cc-pVDZ (Figura 40) e ^{13}C B3LYP/6-31 G (Figura 41) calculados para a estrutura em análise apresentaram aceitáveis coeficientes de correlação (R^2), sendo eles 0,9872, 0,9868, 0,9968 e 0,9965, respectivamente. Para a validação cruzada dos dados, os resultados foram satisfatórios a nível de método B3LYP/cc-pVDZ ($s = 0,19$; $sPRESS = 0,045$; $F = 1006,60$; $Q^2 = 98,63$ % para δH e $s = 3,43$; $sPRESS = 0,91$; $F = 5.010,56$; $Q^2 = 99,66$ %) para δC quando comparado com a método B3LYP/6-31 G como é mostrado nas Tabelas 29 e 30. Portanto, a análise estatística dos resultados revela que o método B3LYP/cc-pVDZ gera melhores resultados tanto para δ de 1H e quanto para de ^{13}C , mostrando que pode o método pode servir para a identificação ou elucidação de compostos orgânicos semelhantes ao da julocrotina. Uma vez que os resultados experimentais de 1H e ^{13}C descritos na literatura (ABREU et al., 2001) e os resultados dos deslocamentos teóricos são quantitativamente semelhantes, mostrando que há uma concordância linear entre os dados, pode-se dizer que método estatístico aplicado é útil para auxiliar na obtenção de valores teóricos de ressonância magnética nuclear.

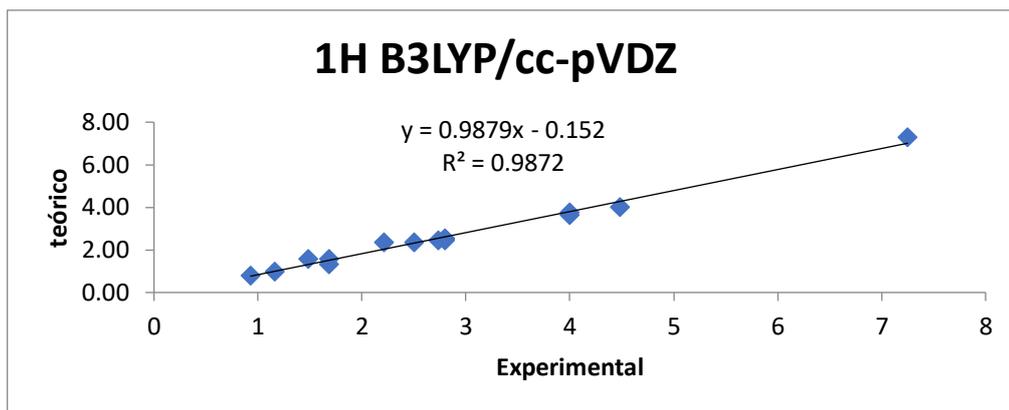
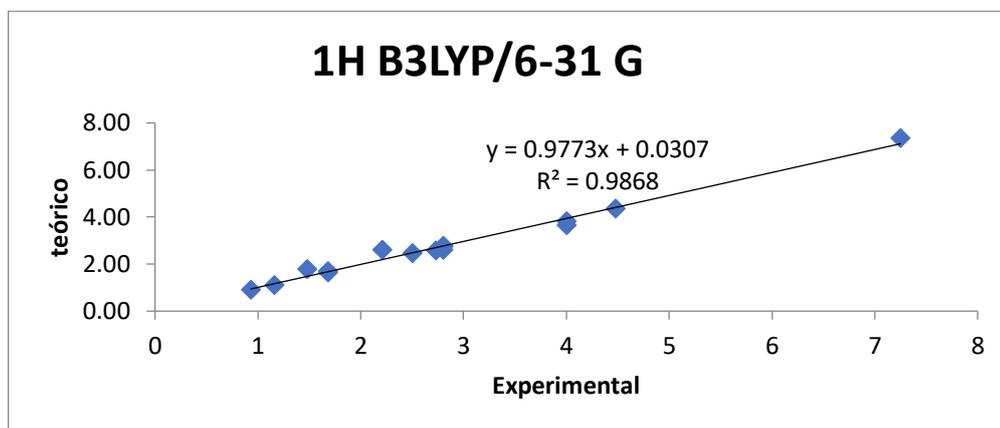
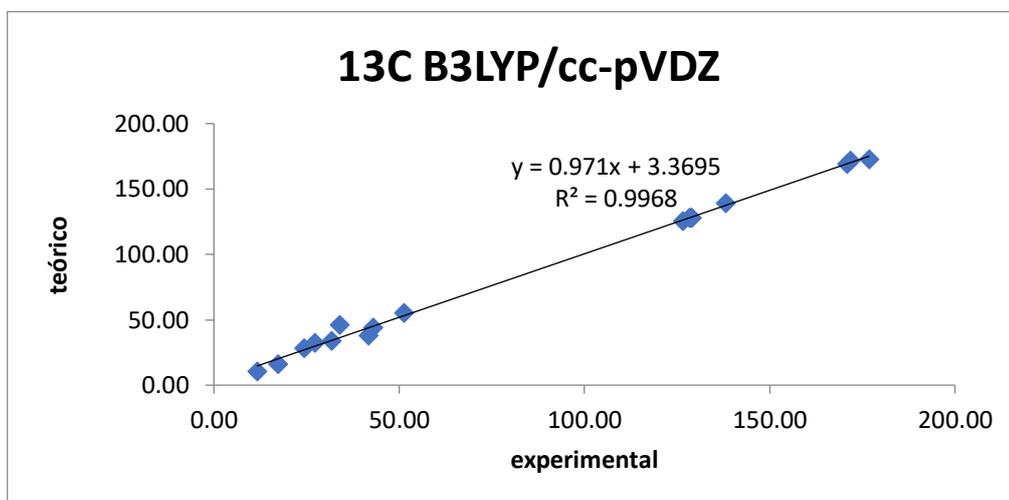
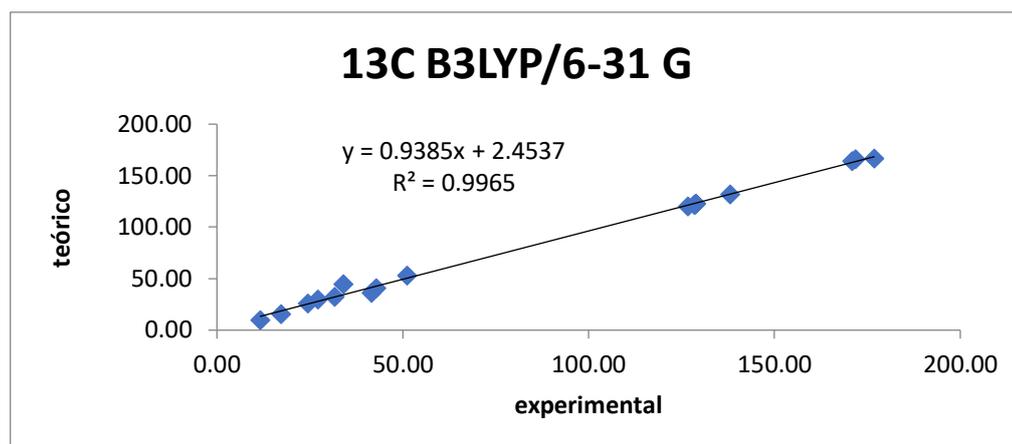
Figura 38. Gráfico ^1H com método B3LYP/cc-pVDZ para a julocrotinaFigura 39. Gráfico ^1H com método B3LYP/6-31 G para a julocrotinaFigura 40. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/cc-pVDZ para a julocrotina

Figura 41. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/6-31 G para a julocrotina



As Tabelas 25 e 26 apresentam a proximidade entre os valores teóricos dos deslocamentos químicos usando os métodos B3LYP/6-31 G e B3LYP/cc-pVDZ e os experimentais, bem como os valores residuais (RS) em ppm para cada átomo de carbono e hidrogênio da estrutura crotonimida A (Figura 04 A) para RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente. Para ambos os métodos os valores residuais foram baixos, o que afirma que o modelo computacional utilizado foi eficaz ao descrever o comportamento teórico dos dados de RMN.

A análise estatística dos dados mostra que os modelos calculados para a estrutura em análise apresentaram aceitáveis coeficientes de correlação ($R^2 = 99,24\%$ para ^1H B3LYP/cc-pVDZ (Figura 42), $99,21\%$ para ^1H B3LYP/6-31 G (Figura 43), $99,90\%$ para ^{13}C B3LYP/cc-pVDZ (Figura 44) e $99,88\%$ para ^{13}C B3LYP/6-31 G (Figura 45) além de estarem bem ajustados. Para a validação cruzada dos dados, os resultados foram satisfatórios ($s = 0,23$; $s\text{PRESS} = 0,050$; $F = 1560,19$; $Q^2 = 99,20\%$ para δH e $s = 1,95$; $s\text{PRESS} = 0,56$; $F = 13.606,81$; $Q^2 = 99,99\%$ para δC) para o método B3LYP/cc-pVDZ quando comparado com B3LYP/6-31 G como é mostrado nas Tabelas 29 e 30. Portanto, a análise estatística dos resultados revela que o método B3LYP/cc-pVDZ gera melhores resultados tanto para δ de ^1H e quanto para de ^{13}C , mostrado que esse método pode servir para a identificação ou elucidação de compostos orgânicos semelhantes ao da crotonimida A.

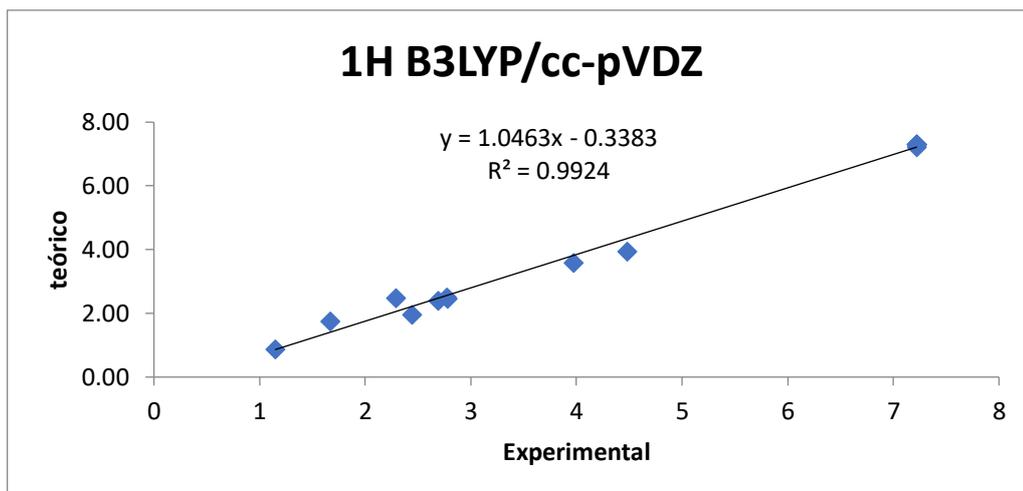
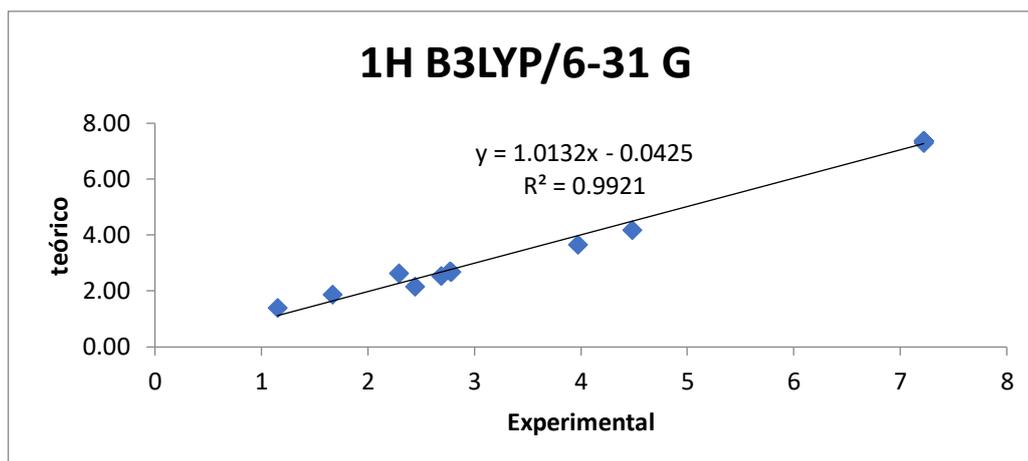
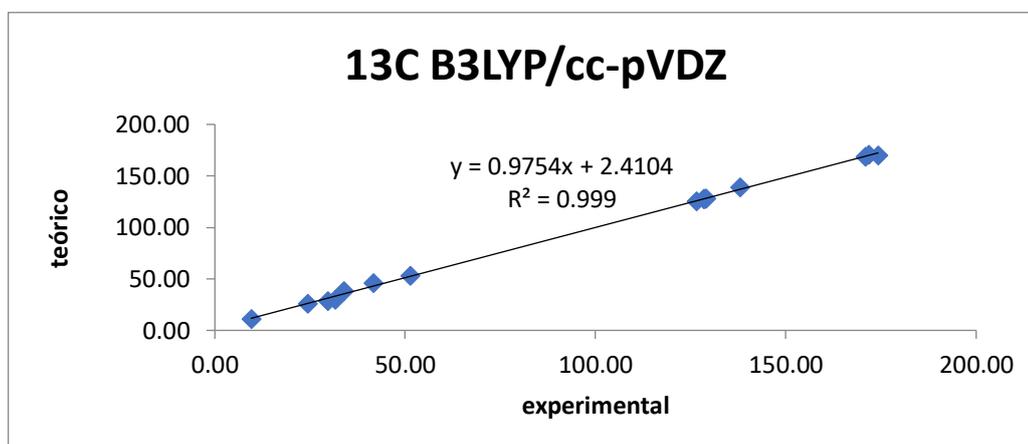
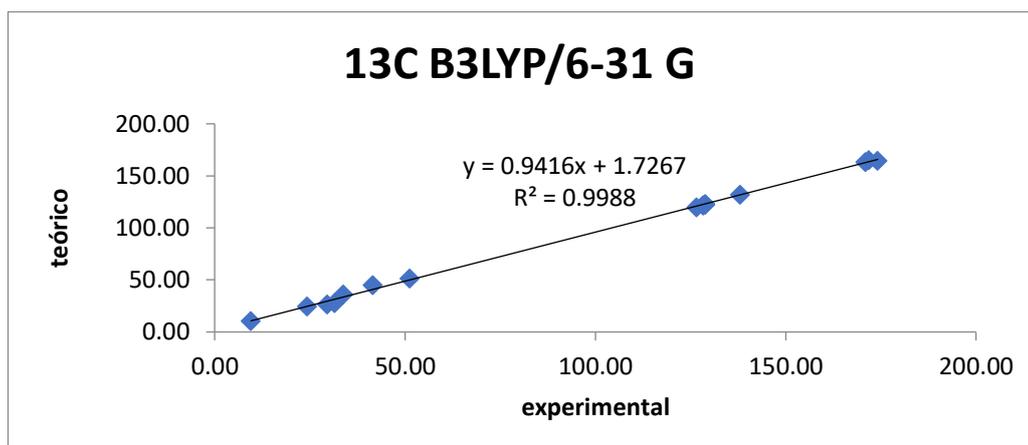
Figura 42. Gráfico ^1H com método B3LYP/cc-pVDZ para a crotonimida AFigura 43. Gráfico ^1H com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida AFigura 44. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/cc-pVDZ para a crotonimida A

Figura 45. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida A

Uma vez que os resultados experimentais de ^1H e ^{13}C descritos na literatura (TRINDADE, 2010) e os resultados dos deslocamentos teóricos são quantitativamente semelhantes, mostrando que há uma concordância linear entre os dados, pode-se dizer que método estatístico aplicado é útil para auxiliar na obtenção de valores teóricos de ressonância magnética nuclear.

Tabela 25. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^1H RMN (ppm) da crotonimida A

Posição	Experimental (TRINDADE, 2010)	B3LYP/6-31 G			B3LYP/CC-PVDZ		
		Em CH_3Cl	Resíduo	Predito	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito
3	4,48	4,18	0,30	4,17	3,93	0,55	4,08
4α	2,44	2,16	0,28	2,18	1,97	0,47	2,21
4β	1,67	1,87	0,20	1,88	1,75	0,08	2,00
5α	2,69	2,53	0,16	2,53	2,40	0,29	2,62
5β	2,77	2,70	0,07	2,71	2,50	0,27	2,71
2'	7,22	7,36	0,14	7,30	7,30	0,07	7,29
3'	7,22	7,36	0,14	7,31	7,30	0,08	7,30
4'	7,22	7,29	0,07	7,23	7,23	0,01	7,23
5'	7,22	7,37	0,15	7,31	7,30	0,08	7,30
6'	7,22	7,37	0,15	7,32	7,30	0,08	7,30
7'^a	2,78	2,67	0,11	2,68	2,47	0,31	2,68
8'^a	3,97	3,65	0,32	3,64	3,60	0,37	3,76
2''^a	2,29	2,64	0,35	2,65	2,48	0,19	2,69
3''^a	1,15	1,40	0,25	1,42	0,88	0,27	1,17

^a. Valores médios

Tabela 26. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^{13}C RMN (ppm) da crotonimida A

Posição	Experimental	B3LYP/6-31 G			B3LYP/CC-PVDZ		
	(TRINDADE, 2010)	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito
2	171,81	165,17	6,64	173,58	170,57	1,24	172,40
3	51,31	51,64	0,33	53,01	53,47	2,16	52,34
4	24,32	24,39	0,07	24,07	26,26	1,94	24,45
5	31,61	28,14	3,47	28,05	29,63	1,99	27,90
6	170,96	163,55	7,41	171,86	168,54	2,42	170,32
1'	138,04	131,85	6,19	138,19	139,35	1,31	140,39
2'	128,92	122,76	6,16	128,54	128,21	0,71	128,97
3'	128,42	121,93	6,49	127,66	127,83	0,59	128,58
4'	126,57	120,15	6,42	125,76	125,66	0,91	126,36
5'	128,42	121,91	6,51	127,63	127,78	0,64	128,53
6'	128,92	122,69	6,23	128,46	128,10	0,82	128,86
7'	33,85	36,42	2,57	36,84	38,43	4,58	36,93
8'	41,58	45,06	3,48	46,02	46,09	4,51	44,78
1''	174,18	164,52	9,66	172,89	170,05	4,13	171,87
2''	29,63	26,59	3,04	26,40	28,37	1,26	26,61
3''	9,53	10,29	0,76	9,09	10,97	1,44	8,78

O gráfico de probabilidade de resíduos mostrado na figura 46 mostra que todos os resíduos avaliados se encontram dentro da região tracejada, já em relação ao gráfico mostrado pela figura 47, apenas um resíduo se encontra fora da região delimitada. Neste caso o gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida A que forneceu melhores resultados foi para o método B3LYP/6-31 G.

Figura 46. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida A com método B3LYP/6-31 G

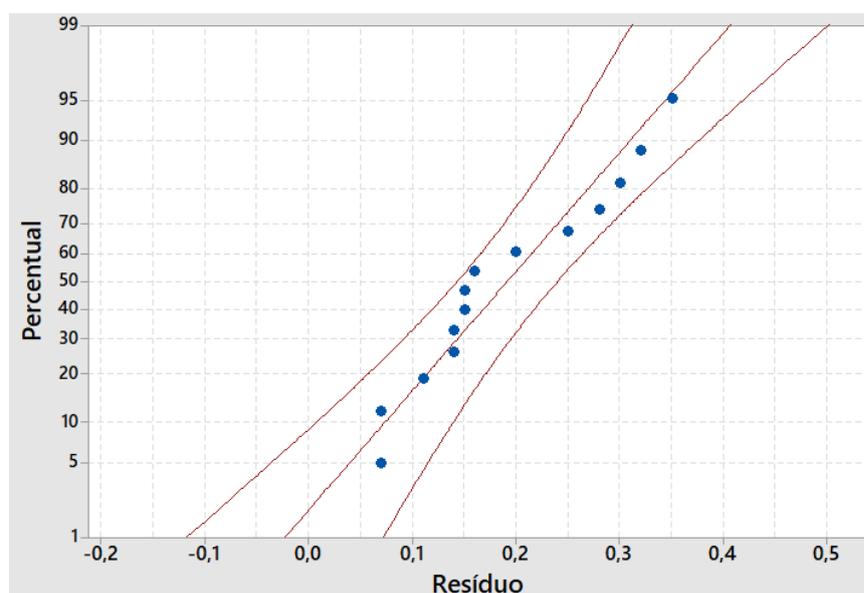
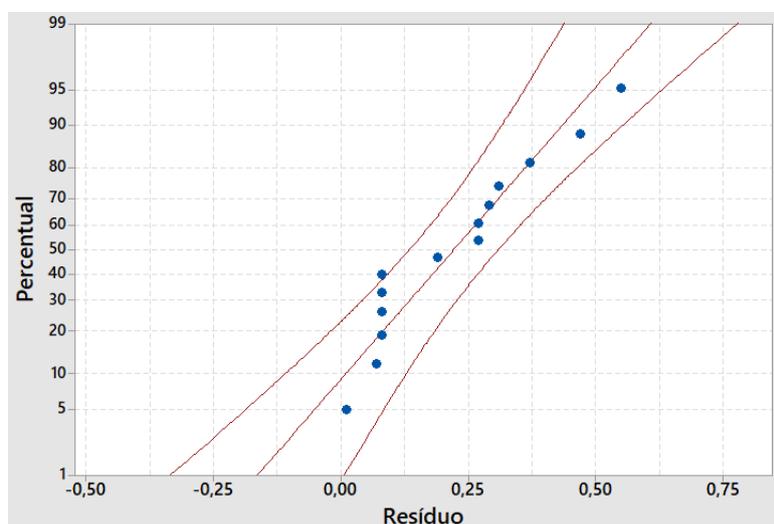


Figura 47. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida A com método B3LYP/cc-pvDZ



Para os gráficos mostrados nas figuras 48 e 49, somente um ponto se encontra fora da região de 95% de probabilidade de passar a verdadeira reta do gráfico. Pode-se observar também que os resíduos são menores para RMN C^{13} da crotonimida A com método B3LYP/cc-pvDZ. Neste caso o método B3LYP/cc-pvDZ gerou melhores resultados em comparação ao método B3LYP/6-31 G.

Figura 48. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da crotonimida A com método B3LYP/6-31 G

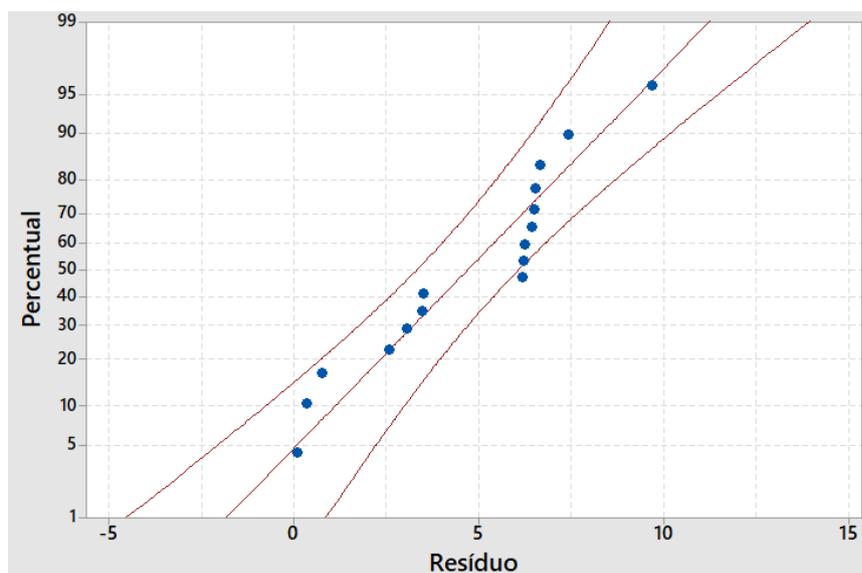
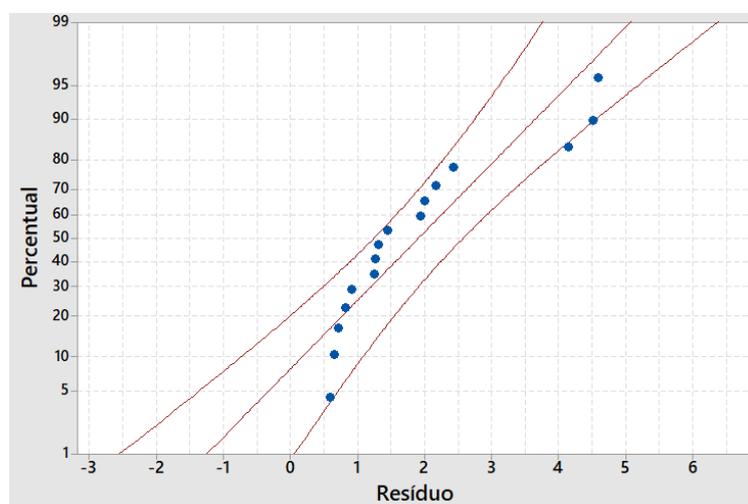


Figura 49. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da crotonimida A com método B3LYP/cc-pvDZ



As Tabelas 27 e 28 apresentam a proximidade entre os valores teóricos dos deslocamentos químicos usando os métodos B3LYP/6-31 G e B3LYP/cc-pVDZ e os experimentais, bem como os valores residuais (RS) em ppm para cada átomo de carbono e hidrogênio da estrutura crotonimida B (Figura 04 B) para RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente. Para ambas os métodos os valores residuais foram baixos, o que afirma que o modelo computacional utilizado foi eficaz ao descrever o comportamento teórico dos dados de RMN.

A análise estatística dos dados mostra que os modelos calculados para a estrutura em análise apresentaram aceitáveis coeficientes de correlação (99,72% para ^1H B3LYP/cc-pVDZ (Figura 50), 99,86% para ^1H B3LYP/6-31 G (Figura 51), 99,96% para ^{13}C com método B3LYP/cc-pVDZ (Figura 52) e 99,94% para ^{13}C com método B3LYP/6-31 G (Figura 53) além de estarem bem ajustados. Para a validação cruzada dos dados, os resultados foram satisfatórios ($s = 0,098$; $s\text{PRESS} = 0,022$; $F = 9.199,75$; $Q2 = 99,80\%$ para δH e $s = 1,19$; $s\text{PRESS} = 0,18$; $F = 37.861,35$; $Q2 = 99,96\%$ para δC) como é mostrado nas Tabelas 29 e 30. Portanto, a análise estatística dos resultados revela que a método B3LYP/6-31 G geram melhores resultados para de para ^1H e B3LYP/cc-pVDZ para ^{13}C . Uma vez que os resultados experimentais de ^1H e ^{13}C descritos na literatura (TRINDADE, 2010) e os resultados dos deslocamentos teóricos são quantitativamente semelhantes, mostrando que há uma concordância linear entre os dados.

Figura 50. Gráfico ^1H com método B3LYP/cc- pVDZ para a crotonimida B

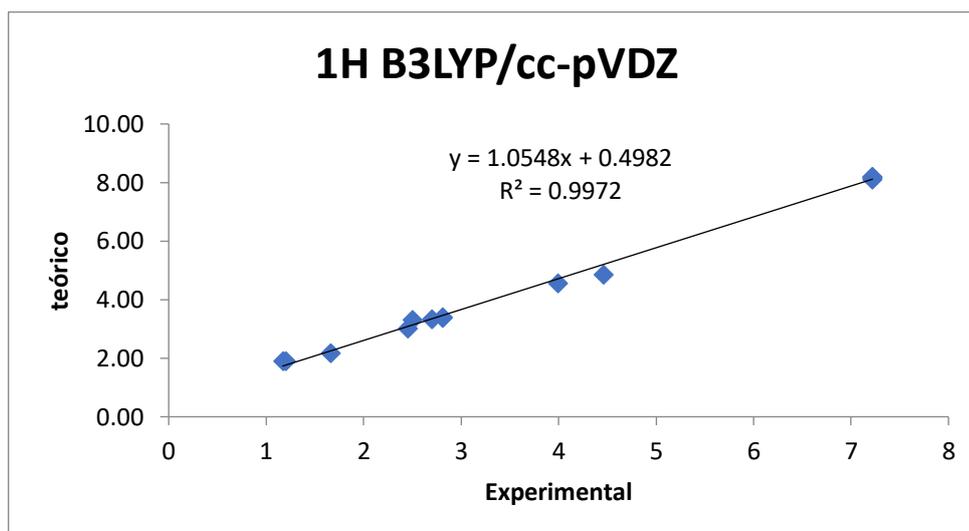


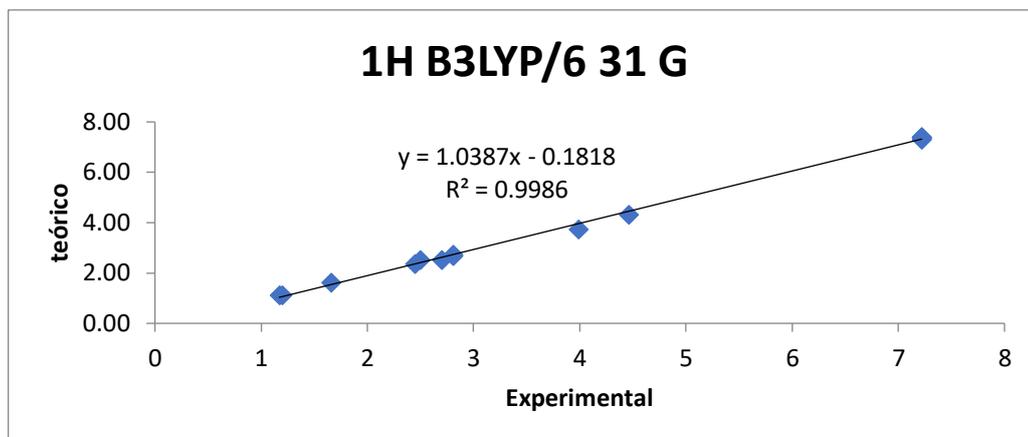
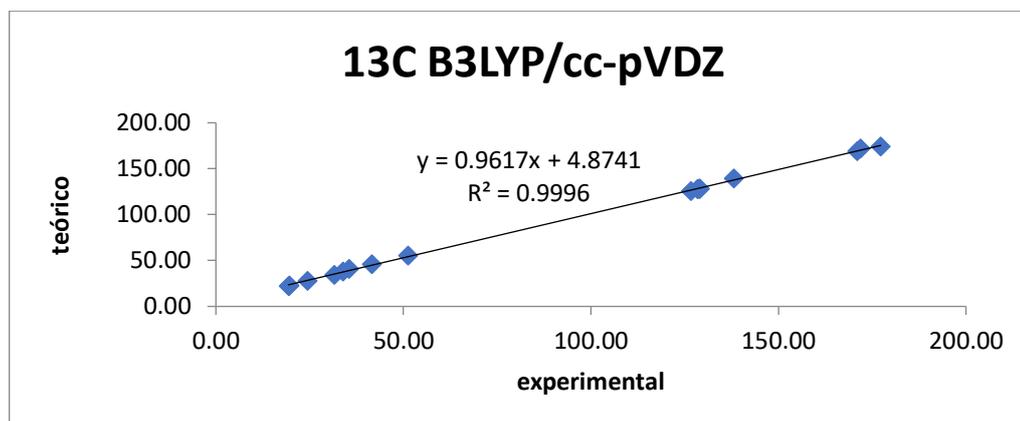
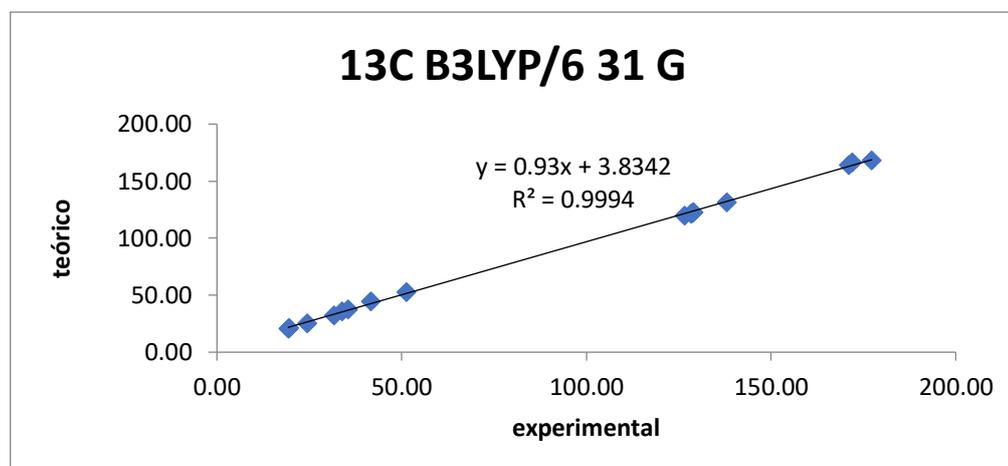
Figura 51. Gráfico ^1H com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida BFigura 52. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/cc-pVDZ para a crotonimida BFigura 53. Gráfico ^{13}C com método B3LYP/6-31 G para a crotonimida B

Tabela 27. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^1H RMN (ppm) da crotonimida B

Posição	Experimental (TRINDADE, 2010)	B3LYP/6-31 G			B3LYP/CC-PVDZ		
		Em CH_3Cl	Resíduo	Predito	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito
3	4,46	4,33	0,13	4,34	4,86	0,40	4,14
4α	2,50	2,51	0,01	2,59	3,31	0,81	2,67
4β	1,66	1,61	0,05	1,72	2,18	0,52	1,60
5α	2,70	2,53	0,17	2,61	3,33	0,63	2,68
5β	2,81	2,74	0,07	2,81	3,41	0,60	2,76
2'	7,22	7,33	0,11	7,24	8,15	0,93	7,26
3'	7,22	7,37	0,15	7,27	8,18	0,96	7,28
4'	7,22	7,29	0,07	7,20	8,12	0,90	7,22
5'	7,22	7,40	0,18	7,29	8,20	0,98	7,30
6'	7,22	7,39	0,17	7,29	8,20	0,98	7,30
7'^a	2,81	2,69	0,12	2,76	3,37	0,56	2,73
8'^a	3,99	3,72	0,27	3,76	4,57	0,58	3,86
2''	2,45	2,36	0,09	2,44	3,02	0,57	2,39
3''^a	1,20	1,13	0,07	1,26	1,91	0,71	1,34
4''^a	1,17	1,13	0,04	1,26	1,91	0,74	1,33

^a. Valores médios

Tabela 28. Deslocamentos químicos experimentais e teóricos para ^{13}C RMN (ppm) da crotonimida B

Posição	Experimental	B3LYP/6-31 G			B3LYP/CC-PVDZ		
	(TRINDADE, 2010)	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito	Em CH_3Cl	Resíduo	Predito
2	171,87	166,45	5,42	174,86	171,67	0,20	173,44
3	51,23	52,97	1,74	52,83	55,46	4,23	52,60
4	24,34	25,67	1,33	23,48	27,59	3,25	23,62
5	31,62	32,37	0,74	30,68	33,93	2,31	30,21
6	170,95	164,36	6,59	172,61	169,30	1,65	170,97
1'	138,07	131,81	6,26	137,61	139,33	1,26	139,81
2'	128,92	122,66	6,26	127,77	128,09	0,83	128,12
3'	128,42	121,93	6,49	126,98	127,86	0,56	127,88
4'	126,55	120,19	6,36	125,12	125,72	0,83	125,66
5'	128,42	122,01	6,41	127,07	127,91	0,51	127,93
6'	128,92	122,78	6,14	127,90	128,16	0,76	128,19
7'	33,85	36,10	2,25	34,70	38,10	4,25	34,54
8'	41,58	44,91	3,33	44,17	45,97	4,39	42,73
1''	177,27	168,20	9,07	176,74	174,31	2,96	176,19
2''	35,43	37,97	2,54	36,70	41,12	5,69	37,69
3''	19,33	20,69	1,36	18,13	22,12	2,79	17,93
4''	19,48	21,41	1,93	18,90	22,87	3,39	18,71

As figuras 54 e 55 mostram que todos os resíduos analisados estão dentro das linhas tracejadas. Pode-se observar também que o gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida B com método B3LYP/6-31 G apresenta menores resíduos em relação ao método B3LYP/cc-pvDZ, sendo este gerou melhores resultados.

Figura 54. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida B com método B3LYP/6-31 G

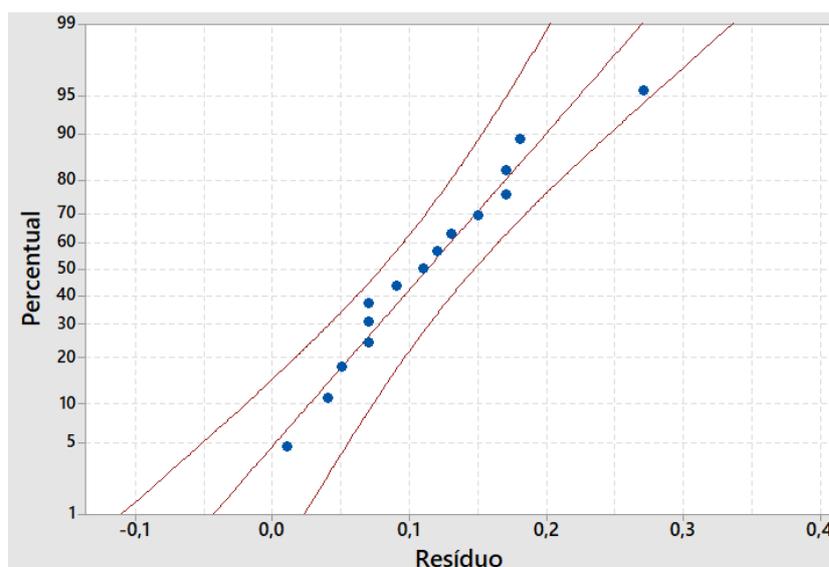
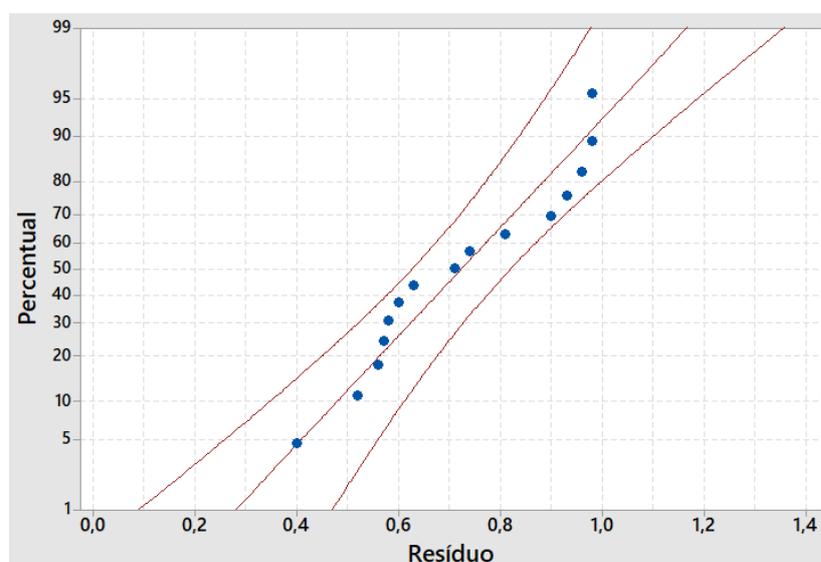


Figura 55. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN H^1 da crotonimida B com método B3LYP/cc-pvDZ



Na Figura 56 observa-se que apenas um dos resíduos avaliados se encontra-se fora, porém bem próxima, da região tracejada (região do gráfico onde existe 95% de probabilidade de passar a verdadeira reta do gráfico). Já na Figura 57, todos os resíduos analisados encontram-se dentro da região. Além disso os resíduos são menores quando se utiliza o método B3LYP/cc-pvDZ em comparação ao método B3LYP/6-31 G. Neste caso o gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da julocrotina gera melhores resultados para o método B3LYP/cc-pvDZ.

Figura 56. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da crotonimida B com método B3LYP/6-31 G

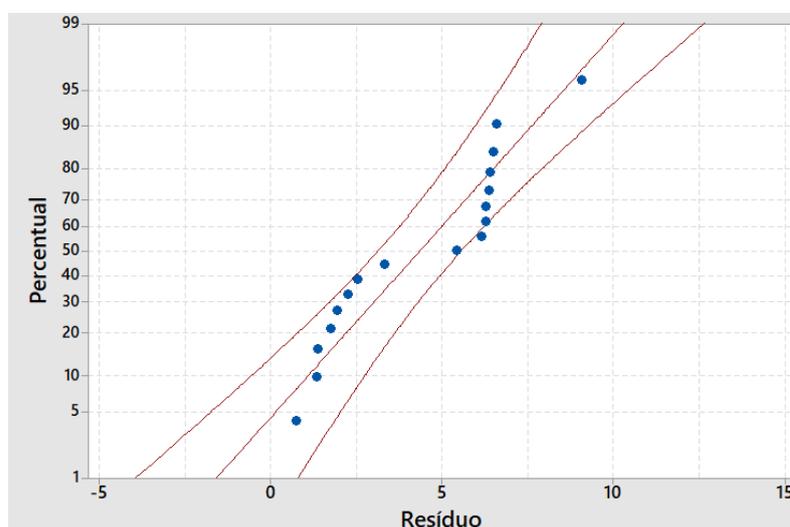


Figura 57. Gráfico de probabilidade de resíduo para RMN C^{13} da crotonimida B com método B3LYP/cc-pvDZ

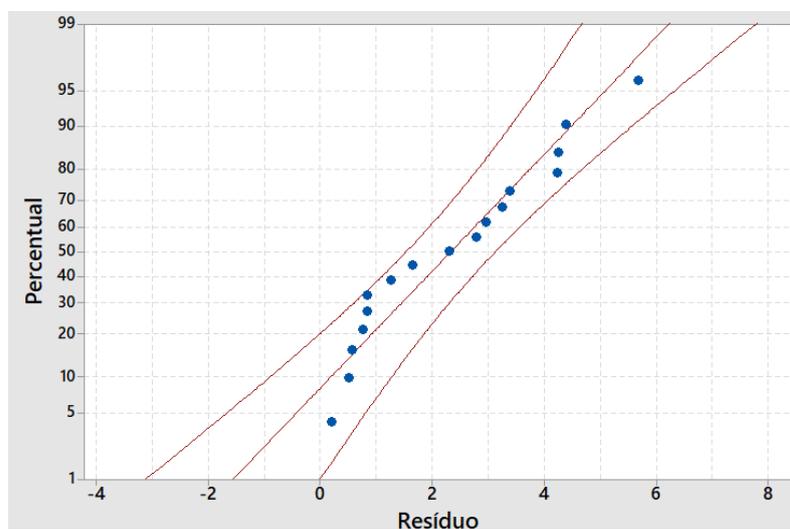


Tabela 29. Correlações e parâmetros de ajuste linear para as bandas de absorção de RMN para δH calculado em clorofórmio para julocrotina, crotonimida A e crotonimida B

	a^a	b	R² (%)	EAM^b	EAMC^c	F	s	PRESS	sPRESS	Q² (%)
Clorofórmio										
Julocrotina										
B3LYP/cc-pVDZ	0,15	0,99	98,72	0,23	0,14	1.006,60	0,19	1,0	0,045	98,60
B3LYP/6-31G	0,03	0,97	98,68	0,14	0,13	973,06	0,19	0,9	0,043	98,60
Crotonimida A										
B3LYP/cc-pVDZ	0,54	1,05	99,24	0,18	0,13	1.560,19	0,23	0,8	0,05	99,20
B3LYP/6-31G	0,04	1,01	99,21	0,16	0,14	1.499,15	0,23	0,8	0,05	99,10
Crotonimida B										
B3LYP/cc-pVDZ	0,05	1,05	99,72	0,60	0,08	4.585,99	0,14	0,3	0,02	99,70
B3LYP/6-31G	0,18	1,04	99,86	0,10	0,06	9.199,75	0,01	0,2	0,02	99,80

^a = Parâmetros de ajuste linear referem-se: $\delta_{\text{calc}} = a + b\delta_{\text{exp}}$; ^b = Erro Médio: $EAM = \sum n | \delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}} | / n$; ^c = Erro Médio Corrigido: $EAMC = \sum n | \delta_{\text{corr}} - \delta_{\text{exp}} | / n$

Tabela 30. Correlações e parâmetros de ajuste linear para as bandas de absorção de RMN para δC calculado em clorofórmio para julocrotina, crotonimida A e crotonimida B

	a^a	b	R² (%)	EAM^b	EAMC^c	F	s	PRESS	sPRESS	Q² (%)
Clorofórmio										
Julocrotina										
B3LYP/cc-pVDZ	3,37	0,97	99,68	2,53	2,21	5.010,56	3,43	238,4	0,91	99,68
B3LYP/6-31G	2,45	0,94	99,65	4,95	2,40	4.525,81	3,49	245,4	0,92	99,65
Crotonimida A										
B3LYP/cc-pVDZ	2,41	0,98	99,99	1,92	1,34	13.606,81	1,95	70,9	0,56	99,99
B3LYP/6-31G	1,73	0,94	99,88	4,71	1,49	12.142,06	1,99	73,5	0,57	99,90
Crotonimida B										
B3LYP/cc-pVDZ	4,87	0,96	99,96	2,34	1,04	37.861,35	1,19	27,6	0,33	99,96
B3LYP/6-31G	3,83	0,93	99,94	4,37	1,29	24.562,49	1,43	40,20	0,40	99,93

^a = Parâmetros de ajuste linear referem-se: $\delta_{\text{calc}} = a + b\delta_{\text{exp}}$; ^b = Erro Médio: $EAM = \sum n | \delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}} | / n$; ^c = Erro Médio Corrigido: $EAMC = \sum n | \delta_{\text{corr}} - \delta_{\text{exp}} | / n$

5.4 DOCAGEM MOLECULAR

5.4.1 Cálculos de docagem molecular

Os cálculos de docagem molecular foram realizados para as moléculas crotonimida A, crotonimida B e julocrotina presentes na *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ., onde foram pontuadas de acordo com as suas energias de docagem preditas pelo programa Molegro Virtual Docker.

Para os PDBs 1AI9, 1JIJ e 1DIM, as moléculas com os melhores escores foram a crotonimida B, julocrotina e crotonimida A, respectivamente (Tabelas 31, 32 e 33).

Tabela 31. Lista dos compostos e seus respectivos valores de energias de docagem, preditas pelos programas Molegro Virtual Dock (PDB ID: 1AI9)

Moléculas	MolDock Score (Kcal/mol)
Crotonimida A	-114,78
Crotonimida B	-126,71
Julocrotina	-122,92

Tabela 32. Lista dos compostos e seus respectivos valores de energias de docagem, preditas pelos programas Molegro Virtual Dock (PDB ID: 1JIJ)

Moléculas	MolDock Score (Kcal/mol)
Crotonimida A	-104,02
Crotonimida B	-112,18
Julocrotina	-116,68

Tabela 33. Lista dos compostos e seus respectivos valores de energias de docagem, preditas pelos programas Molegro Virtual Dock (PDB ID: 1DIM)

Moléculas	MolDock Score (Kcal/mol)
Crotonimida A	-86,05
Crotonimida B	-83,55
Julocrotina	-84,57

Após a docagem molecular, observou-se que a molécula crotonimida A formou ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da enzima *Candida albicans* (PDB ID: 1AI9), onde duas ligações foram de átomos de oxigênio com átomos de hidrogênio de Lys 57(A) e Arg 56(A) (O --- H-Lys57(A); 2,59 Å e O --- H-Arg56(A); 3,20 Å; 2,89 Å) e uma ligação com um átomo de nitrogênio com um átomo de hidrogênio do resíduo de aminoácido Lys 57(A) (N --- H-Lys57(A); 2,59 Å) (Figuras 58 e 59). Vale ressaltar que esses resíduos de aminoácidos pertencem ao sítio ativo dessa enzima (Figura 60) (SUJATHA; KALLURAYA; JOSHI, 2019).

Figura 58. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Lys 57(A) e Arg 56(A) da enzima *Candida albicans* (2D)

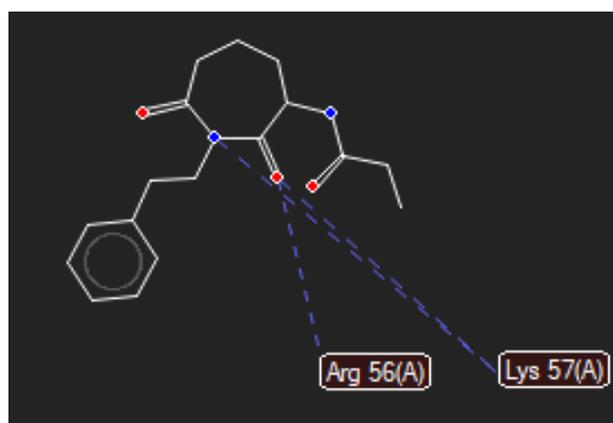


Figura 59. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Lys 57(A) e Arg 56(A) da enzima *Candida albicans* (3D)

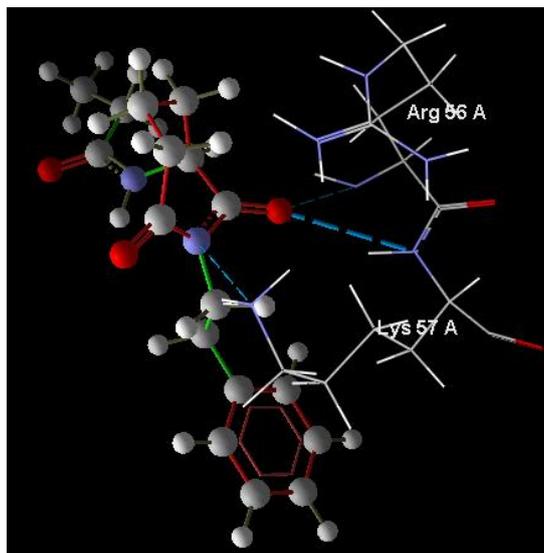
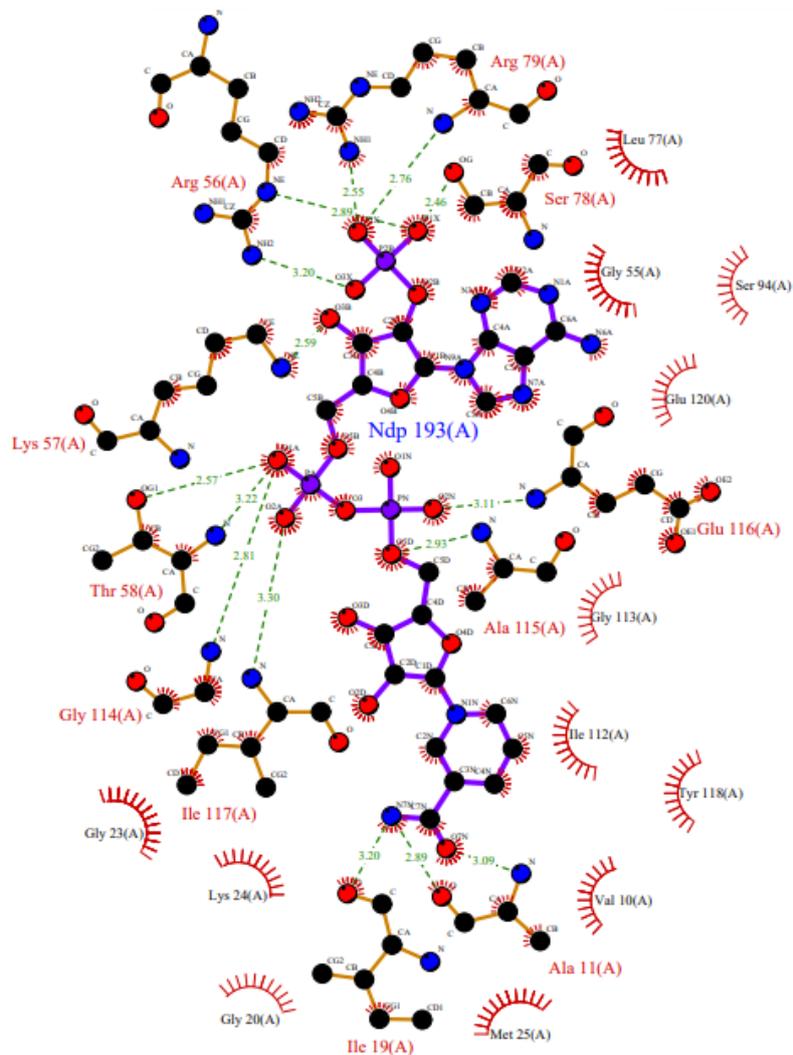


Figura 60. Ligações de resíduos em sítios ativos da enzima *Candida albicans*



A molécula crotonimida A também apresentou interação de ligação de hidrogênio com resíduo de aminoácido, onde um átomo de oxigênio está ligado ao átomo de hidrogênio do resíduo Cys37 (O --- H-Cys37) e um átomo de nitrogênio está ligado ao átomo de hidrogênio do resíduo Gly38 (N --- H-Gly38; 2,45 Å) da enzima *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 1JJJ) (Figuras 61 e 62). O resíduo de aminoácido Gly38 pertence ao sítio ativo da enzima em estudo (ZHENG et al., 2016) (Figura 63).

Figura 61. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Gly38 e Cys37 da enzima *Staphylococcus aureus* (2D)

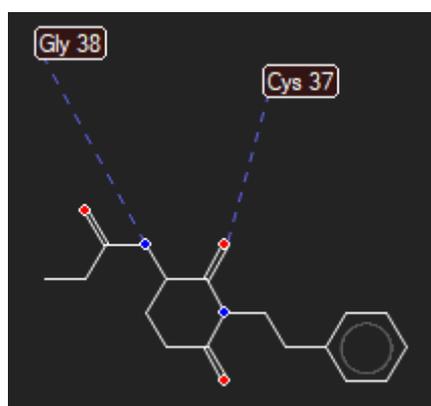


Figura 62. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduos de aminoácidos Gly38 e Cys37 da enzima *Staphylococcus aureus* (3D)

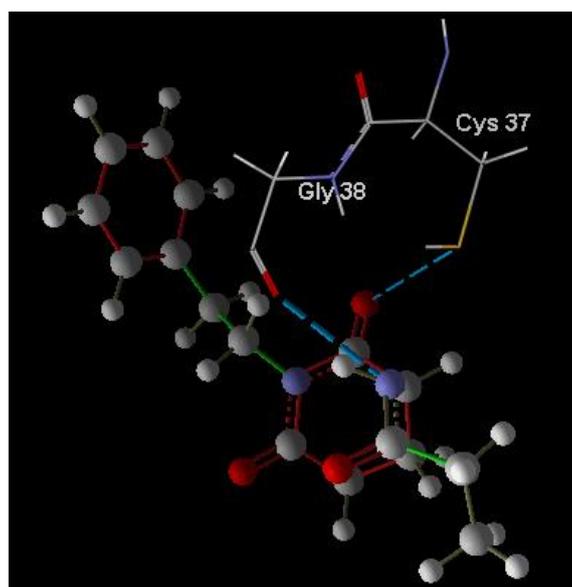
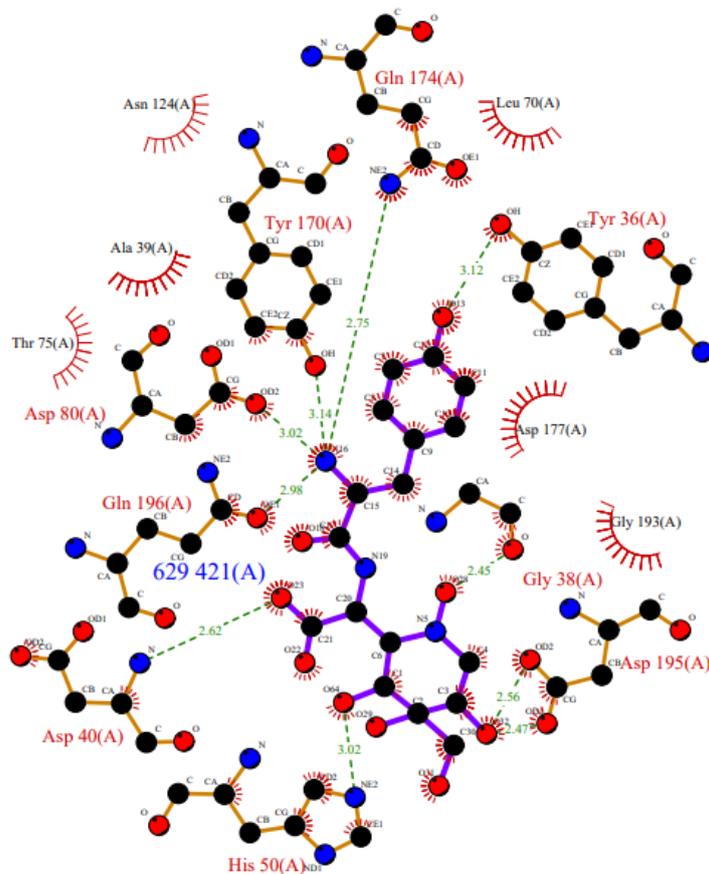


Figura 63. Ligações de resíduos em sítios ativos da enzima *Staphylococcus aureus*



Além disso, a estrutura crotonimida A apresentou interação de hidrogênio, através de um átomo de nitrogênio, ligado ao átomo de hidrogênio do resíduo de aminoácido Asp62 (N --- H-Asp62) da enzima *Salmonella thyphimurium* (PDB ID: 1DIM) (Figuras 64 e 65). Essa interação (hidrofóbica) pertence ao sítio ativo da enzima (Figura 66) (CRENNELL et al.,1993).

Figura 64. Interações entre a estrutura crotonimida A e os resíduo de aminoácido Asp62 da *Salmonella thyphimurium* (2D)

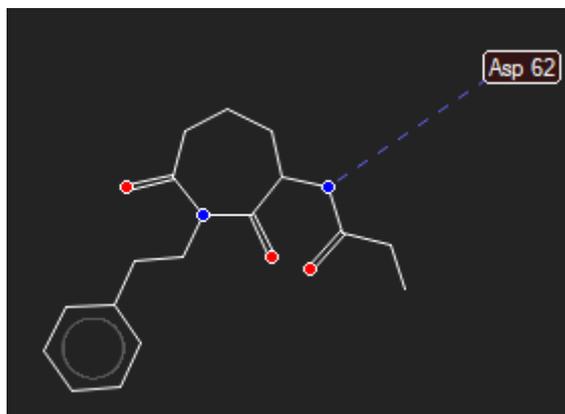


Figura 65. Interações entre a estrutura crotonimida A e o resíduo de aminoácido Asp62 da *Salmonella thyphimurium* (3D)

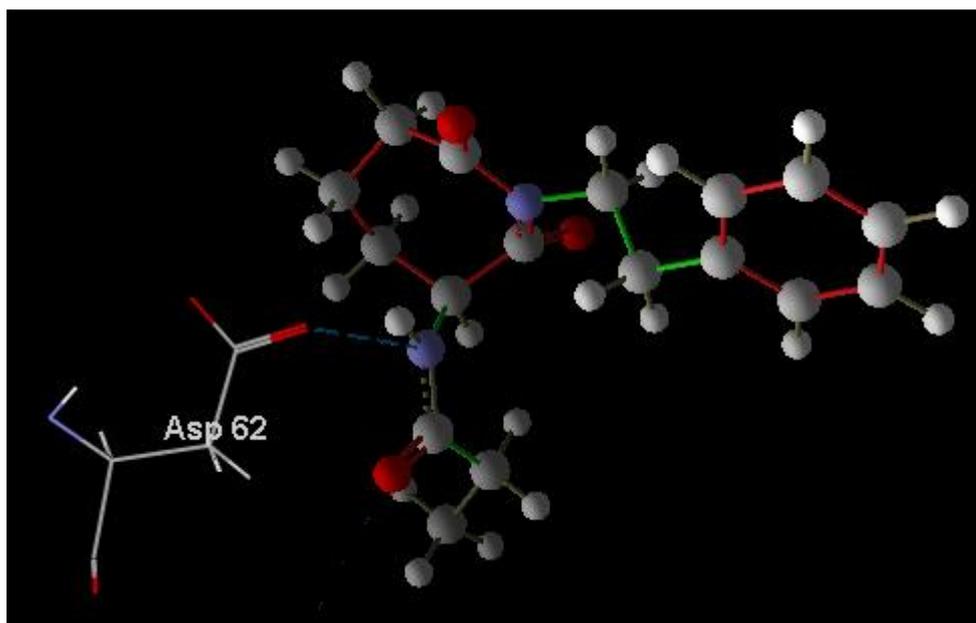
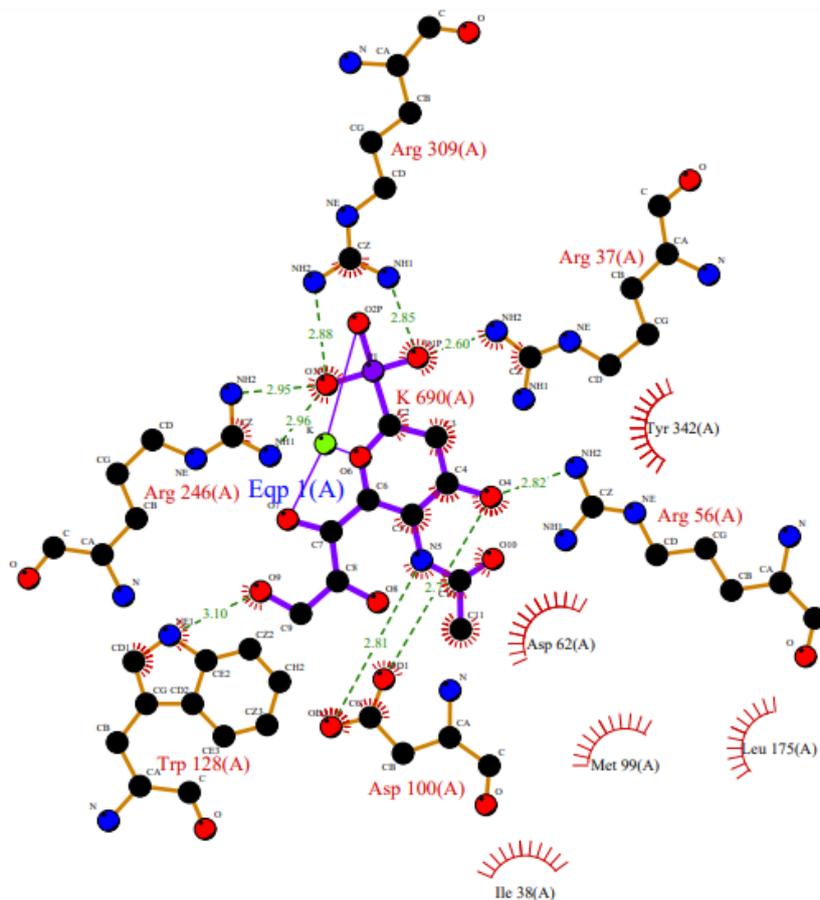


Figura 66. Ligações de resíduos em sítios ativos da enzima *Salmonella thyphimurium*



A molécula crotonimida B apresentou interação de hidrogênio com resíduo de aminoácido da enzima *Candida albicans*, onde a ligação foi composta de átomo de oxigênio com átomo de hidrogênio de Lys57(A) (O --- H-Lys57; 2,59 Å) (Figuras 67 e 68). O resíduo de aminoácido pertence ao sítio ativo dessa enzima (Figura 63) (SUJATHA, KALLURAYA; JOSHI, 2019; VUPPALA, et al. 2019).

Figura 67. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduo Lys57(A) da *Candida albicans* (2D)

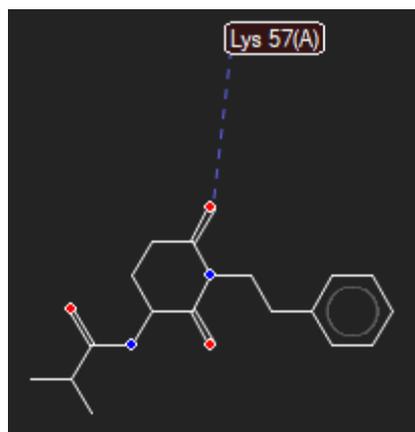
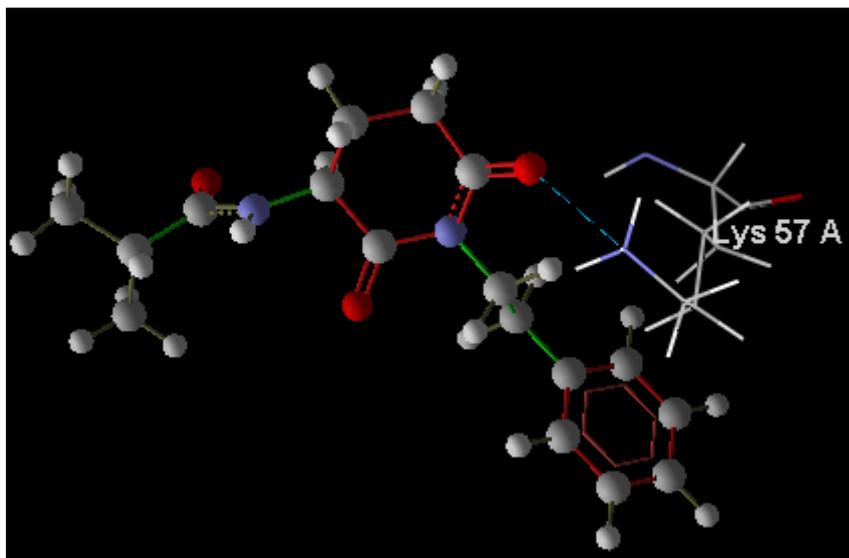


Figura 68. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduo Lys57(A) da *Candida albicans* (3D)



A molécula crotonimida B também apresentou formação de ligação de hidrogênio, através de átomo de oxigênio, frente a átomo de hidrogênio do resíduo de aminoácido Gly193 (O --- H-Gly193) da enzima *Staphylococcus aureus* (BUKOWSKI, WLADYKA; DUBIN, 2010) (Figuras 69 e 70).

Figura 69. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduo de aminoácido Gly193 da *Staphylococcus aureus* (2D)

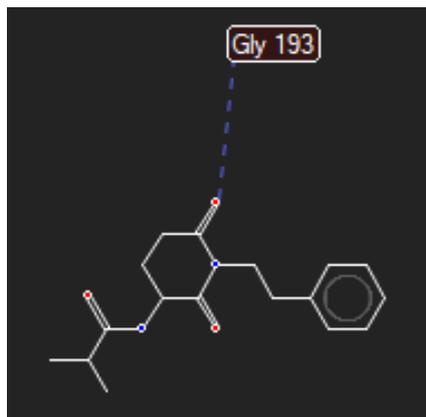
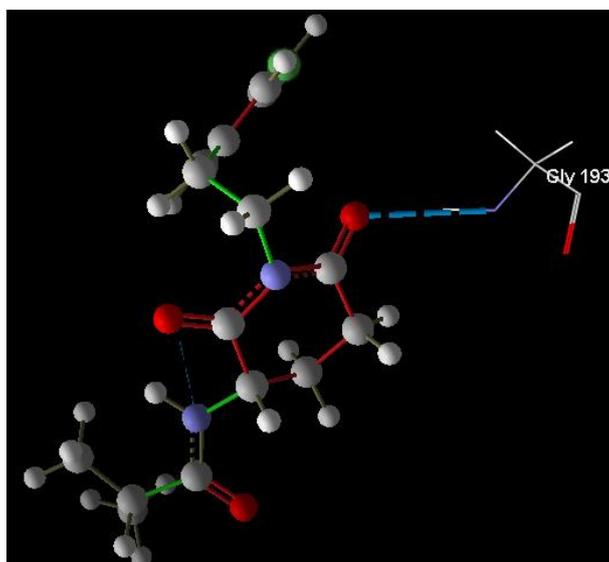


Figura 70. Interações entre a estrutura crotonimida B e o resíduo de aminoácido Gly193 da *Staphylococcus aureus* (3D)



Além disso, a estrutura crotonimida A apresentou interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Tyr128 e Arg56 da enzima *Salmonella thyphimurium*. Neste caso os átomos de oxigênio ligaram-se aos átomos de hidrogênio dos resíduos Trp128 (O --- H-Trp128; 3,10 Å) e Arg56 (N --- H-Arg56; 2,82 Å) (Figuras 71 e 72). Vale ressaltar que esses resíduos de aminoácidos pertencem ao sítio ativo da enzima (Figura 66) (CRENNELL et al.,1993).

Figura 71. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduos de Trp128 e Arg56 da *Salmonella thyphimurium* (2D)

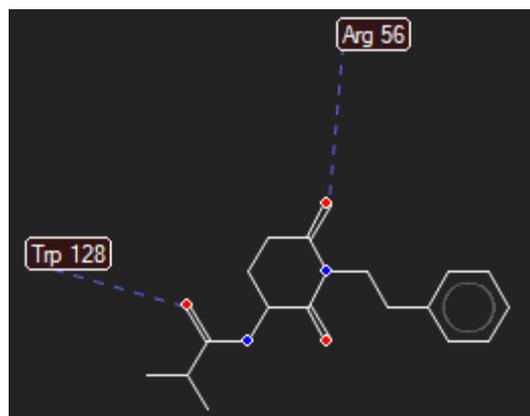
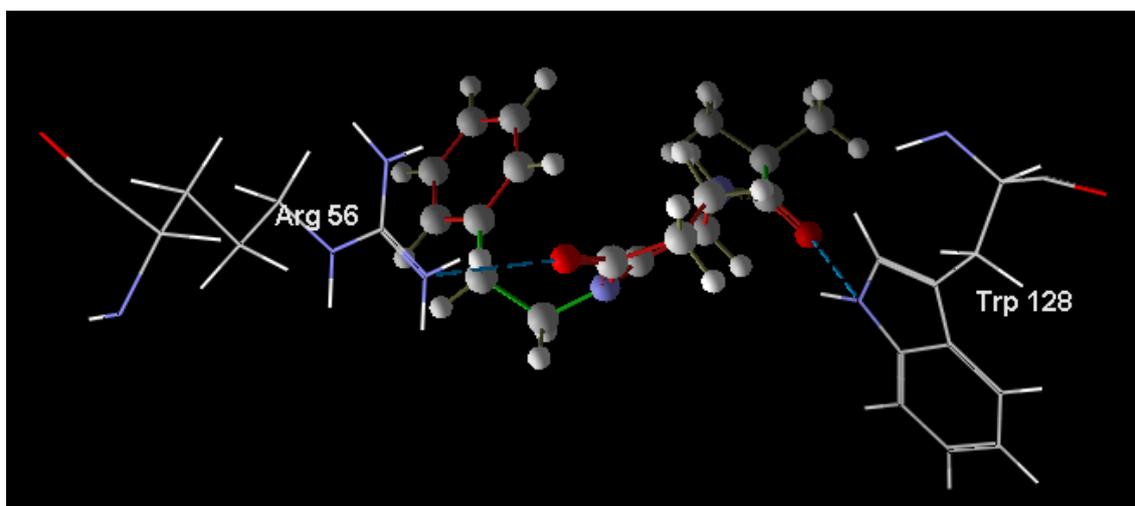


Figura 72. Interações entre a estrutura crotonimida B e os resíduos de Trp128 e Arg56 da *Salmonella thyphimurium* (3D)



Já a molécula julocrotina apresentou interações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da enzima *Candida albicans*. As ligações são de átomos de oxigênio com átomos de hidrogênio de Thr58(A) e Gly114(A) (O --- H-Thr58(A); 2,57 Å e O --- H-Gly114(A); 3,22 Å) (Figuras 73 e 74). Os resíduos de aminoácidos pertencem ao sítio ativo dessa enzima (Figura 60) (VUPPALA, et al. 2019).

Figura 73. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Thr58(A) e Gly114(A) da *Candida albicans* (2D)

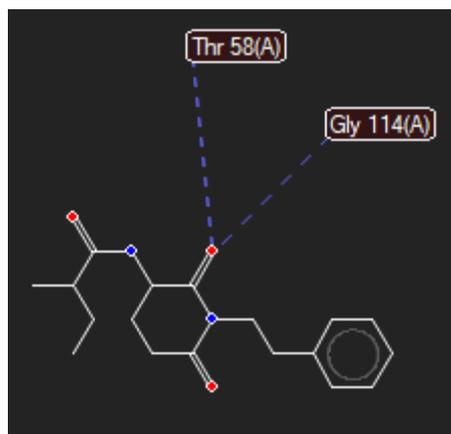
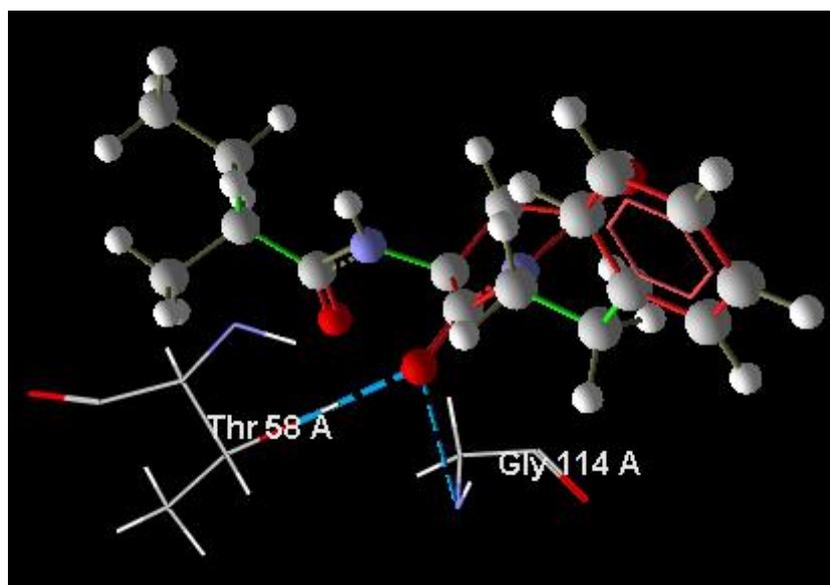


Figura 74. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Thr58(A) e Gly114(A) da *Candida albicans* (3D)



A molécula julocrotina também apresentou ligações de hidrogênios com resíduo de aminoácido através de átomos de oxigênio, ligado a átomos de hidrogênios dos resíduos de aminoácidos Gly193 e Cys37 (O --- H-Gly193 e O --- H-Cys37) da enzima *Staphylococcus aureus* (BUKOWSKI, WLADYKA; DUBIN, 2010; ZHENG et al., 2016) (Figuras 75 e 76).

Figura 75. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Gly193 e Cys37 da *Staphylococcus aureus* (2D)

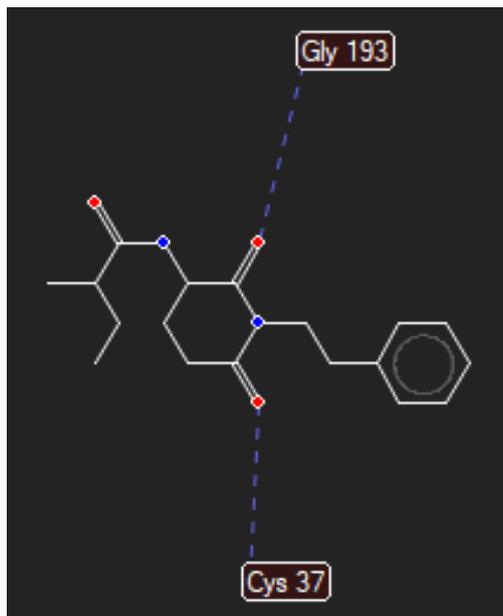
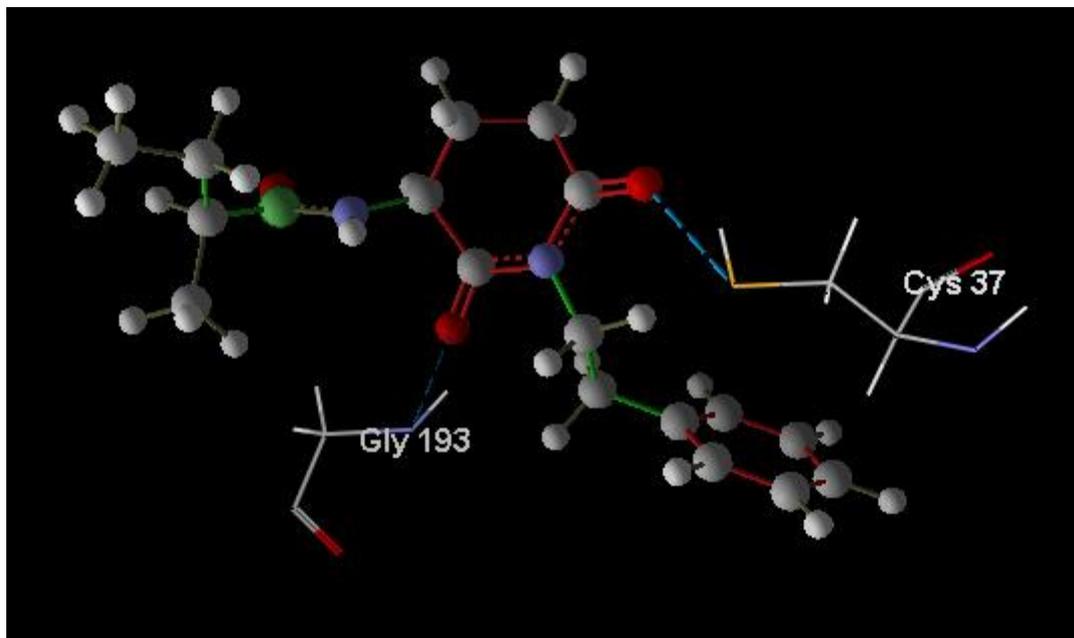


Figura 76. Interações entre a estrutura julocrotina e os resíduos de aminoácidos Gly193 e Cys37 da *Staphylococcus aureus* (3D)



Além disso, a estrutura julocrotina apresentou interação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido da enzima *Salmonella thyphimurium*, através de um átomo de oxigênio com o átomo de hidrogênio do resíduo Thr127 (O --- H-Thr 127) (ALLARD, CLELAND; HOLDEN, 2004) (Figuras 77 e 78).

Figura 77. Interações entre a estrutura julocrotina e o resíduo de aminoácido Thr127 da *Salmonella thyphimurium* (2D)

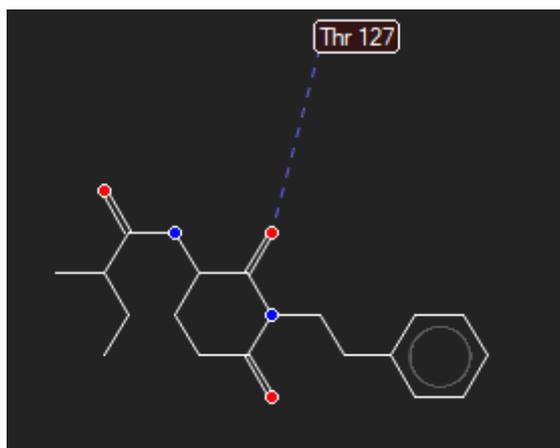
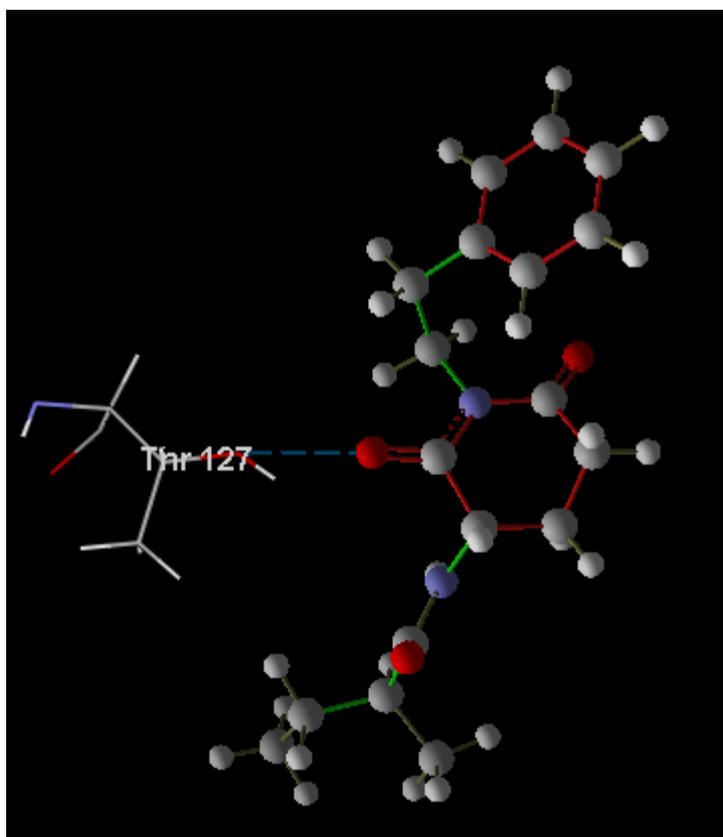


Figura 78. Interações entre a estrutura julocrotina e o resíduo de aminoácido Thr127 da *Salmonella thyphimurium* (3D)



6 CONCLUSÃO

O planejamento experimental Box-Behnken utilizado nesse trabalho foi eficiente para a obtenção das variáveis de saída Rendimento, Polifenóis totais e Atividade Antioxidante.

Para a resposta Rendimento, as variáveis significativas a nível de 95% de confiança, foram as isoladas **temperatura, granulometria, relação massa/solvente** e suas interações binárias e quadráticas. Para a variável Polifenóis Totais, as variáveis isoladas **granulometria, relação massa/solvente** e suas interações binárias e quadráticas. E para variável de saída Avaliação Antioxidante as variáveis **temperatura, granulometria, relação massa/solvente** e suas interações binárias e quadráticas, apresentaram um efeito estatisticamente significativo. Ou seja, as variáveis isoladas **granulometria, relação massa/solvente**, e suas interações binárias e quadráticas foram importantes para a obtenção dos maiores valores das variáveis de resposta em análise.

Os valores teóricos dos deslocamentos químicos quando comparado aos valores experimentais para RMN ^1H e ^{13}C obtidos via funcionais híbridos B3LYP conjugados com a função de base cc-pVDZ (B3LYP/cc-pVDZ) significativas, em quase todas as moléculas, que o método B3LYP/6-31 G. Entretanto, para a análise de ^1H utilizando a estrutura crotonimida B, a função de método B3LYP/6-31 G mostrou-se mais expressiva.

Todas as três estruturas (crotonimida A, crotonimida B e julocrotina) apresentaram pelo menos uma ligação de hidrogênio com os resíduos das enzimas *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella thyphimurium*.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Adicionar a temperatura de secagem como variável de entrada;
- Avaliar as possíveis atividades do óleo essencial da *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ;
- Comparar os resultados das variáveis de resposta entre os métodos de extração quente e a frio;
- Comparar os resultados das variáveis de resposta entre os métodos de extração convencional e supercrítica;
- Realizar a atividade antimicrobiana dos extratos;
- Realizar a dinâmica molecular da julocrotina, crotonimida A e crotonimida B.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. S. et al. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2001.
- AKHNAZAROVA, S.; KAFAROV, V. Experiment optimization in chemistry and chemical engineering. Moscow: MIW Publisher. 1982.
- ALLARD, S. T. M.; CLELAND, W. W.; HOLDEN, H. M. High resolution X-ray structure of dTDP-glucose 4, 6-dehydratase from *Streptomyces venezuelae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 3, p. 2211-2220, 2004.
- ALMAJANO, M.P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, A.L.; GORDON, M. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, p. 55-63, 2008.
- ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, p. 720, 2003.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.
- ANDRADE, E. L. **Otimização experimental da destilação do óleo essencial de *Piper Aduncum* L. por arraste com vapor**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Belém: UFPA, 2009.
- ANTUNES, P. M. et al. The tripartite symbiosis formed by indigenous arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* and soya bean under field conditions. **Journal of agronomy and crop science**, v. 192, n. 5, p. 373-378, 2006.
- ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "*in vitro*" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.517-524, 2006.
- ANVISA - Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº6 de 31 de janeiro de 1995. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/6_95.htm. Acesso em 05/09/19.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- BADKE M.R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Rev.Texto Contexto Enferm**, v. 21, n. 2, p. 363-70. 2012.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BANDOCH, G. F. G. **Estudo por espectroscopia de RMN e cálculos teóricos de derivados da norcânfora e de ditianos**. Dissertação de mestrado em Química. Maringá: UEM, 2008

BARBOSA, P. S. et al. Glutarimide Alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. **Biochem Syst Ecol**, v. 35, p. 887–890. 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, pg. 299, 2001.

BELLA CRUZ, A. B. et al. Métodos “In Vitro” na Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, cap. 7. p. 175-205, 2010.

BERRY, P. E. et al. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *American Journal of Botany*, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.

BERRY, P.; RIINA, R.; SILVA, O. L. M.; SILVA, M. J.; SODRÉ, R. C. Cróton. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015.

BETONI, J. E. C. et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BITTNER, M. et al. Estudio químico de especies de La familia Euphorbiaceae em Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 46, p. 1-15, 2001.

BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n. 1, p. 71-81, 2004.

BLOCK, S. et al. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. **Anticancer research**, v. 25, n. 1A, p. 363-368, 2004.

BOTTERWECK, A. A. M. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

- BOUCHET, N.; BARRIER, L.; FAUCONNEAU, B. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). **Phytotherapy research**, v. 12, n. 3, p. 159-162, 1998.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new Three level Design for the Study of quantitative Variable. **Tecnometrics**, v. 1, p. 445-476, 1960.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S., "Experimental design for the exploration and exploitation of response surfaces". In: CHEW, V., Experimental design in industry, New York: John; Wiley Sons, p. 138-190, 1957.
- BRAGA, J.; **Children and Adults: Activities for Growing Together**. Prentice-Hall, 1976.
- BRANDÃO, M. G. L; Dossê Técnico, Produção de chás e extratos de plantas medicinais. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, pg. 17. 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRATOSIN, D; et al. Flow cytofluorometric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins - evidence that sialic acids control their lifespan. **Glycoconjugate J**, v. 12, p.258-267, 1995.
- BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 9, p. 1663-1672, 1999.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiología médica. **Rio**, v. 498, 2000.
- BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1148-1165, 2010.
- CABALLÉ, G. Le port autoportant des lianes tropicales: une synthèse des stratégies de croissance. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 1703-1716, 1998.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.
- CASTRO, H. G. et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004, p. 113.
- CAVIN, A. et al. Use of on-flow LC/1 H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea* e *nneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of natural products**, v. 61, n. 12, p. 1497-1501, 1998.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégia para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, 2000.

- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.441-449, 2007.
- CHAN, J. H. et al. Selective inhibitors of *Candida albicans* dihydrofolate reductase: activity and selectivity of 5-(aryltio)-2, 4-diaminoquinazolines. **Journal of medicinal chemistry**, v. 38, n. 18, p. 3608-3616, 1995.
- COHEN E.M. L., et al. Um estudo do efeito da flexibilidade explícita da enzima InhA de *M. tuberculosis* na docagem molecular dos inibidores etionamida, triclosano e isoniazida-pentacionoferrato II. 2010.
- COKER, C. et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and infection**, v. 2, n. 12, p. 1497-1505, 2000.
- CORDEIRO, I. et al. Croton in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2014.
- CORDEIRO, I. **Revisão taxonômica de Julocroton Mart. (Euphorbiaceae)**. 1993. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1993.
- CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CARNEIRO-TORRES, D. S.; LIMA, L. R.; CARUZO, M. B. R.; CROSSLEY, Kent B. et al. (Ed.). **Staphylococci in human disease**. John Wiley; Sons, 1997.
- COSTA, C. M; FARIA. L. J. G. Otimização do processo de extração química de óleos vegetais utilizando metodologia de superfície de resposta. In: **Tópicos Especiais em Tecnologia de Produtos Naturais**. UFPA, NUMA, POEMA, p. 220. 1998.
- CRENNELL, S. J. et al. Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella thyphimutium*LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 21, p. 9852-9856, 1993.
- CROSSLEY, Kent B. et al. (Ed.). **Staphylococci in human disease**. John Wiley; Sons, 1997.
- DAHANUKAR, S. A. et al. Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian journal of pharmacology**, v. 32, n. 4, p. S81-S118, 2000.
- DE MOLFETTA, F.A. **Planejamento de Quinonas com atividade Tripanossomicida**. 123 f. Tese de Doutorado em Ciências (Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP. 2007.
- DECKER, E. A. 18 Antioxidant Mechanisms. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**, p. 475, 2008.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, Milwaukee, v. 12, p. 214-219, 1980.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutat. Res.**, v. 567, p. 1-61, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5º Ed. Brasília. 2010.

FEIL, E. J. et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*?. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 11, p. 3307-3316, 2003.

FELIU, D. A. Análise de terpenóides de espécies *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull. Arg.). Dissertação de mestrado. USP, São Paulo. 2011.

FERRAZ, E. M. N. Variação florístico-vegetacional na região do vale do Pajeú, Pernambuco. Recife: UFRPE, 1996.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.

FERSHT, A. R.; KNILL-JONES, J. W.; BEDOUELLE, H., and WINTER, G. Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: A mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism. **Biochemistry**, v. 27, p. 1581– 1587, 1988.

FEY, P. D. et al. Comparative molecular analysis of community-or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 196-203, 2003.

FISHER, J. B; EWERS, F. W. Xylem pathways in liana stems with variant secondary growth. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 108, p. 181-202, 1996.

FONTÃO, H. **PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: aplicação de uma ferramenta Lean Seis Sigma para gestão empresarial em pequenos supermercados varejistas**. 2008. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado–Programa de Gestão e Desenvolvimento Regional, Universidade de Taubaté, Taubaté.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar, trad. Maria Carolina Mardi Guimarães e Cristina Leonhardt. **Porto Alegre: Artmed**, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRISCH, M. J., et al. Gaussian 03, Revision B.04; Gaussian: Pittsburgh, PA, United States of America, 2003.

GALLENMULLER, F.; MULLER, U.; ROWE, N.; SPECK, T. The growth form of *Croton pullei* (Euphorbiaceae) - Functional morphology and biomechanics of a neotropical Liana. **Plant Biology**, v. 1, p. 50-61, 2001.

GALVÃO, E. L. **Extração do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* J. com CO2 pressurizado**. 2004. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

GAUDIO A. C.; ZANDONADE, E. Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. **Química Nova**. 2001; vol. 24, p.

658-71. ISSN ISSN 0100-4042. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000500013>.

GEORGE, M. L. Lean seis sigma para serviços: como utilizar a velocidade Lean e qualidade seis sigma para melhorar serviços e transações. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2004.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement_5, p. S350-S359, 2008.

GOVAERTS, R. et al. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS; UFSC, p. 13-26, 2001.

GUIMARÃES, L. A. C. **O gênero CROTON L. seção CYCLOSTIGMA Griseb. e seção LUNTIA (Raf.) GL Webster (EUPHORBIACEAE) ocorrentes na Amazônia brasileira**. 2006. Tese de Doutorado. UFRA/MPEG.

GUIMARÃES, L. R. C. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania* (L.) *amazonensis*. **Parasitol Res**, v. 107, p. 1075-1081, 2010.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow**. Mol Aspects Med. v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 11, p. 966-968, 1981.

GUTIÉRREZ, I. E. et al. Plantas Medicinais no Semiárido: conhecimentos populares e acadêmicos. **SciELO-EDUFBA**, Salvador, Bahia, Brasil. 2010.

HAALAND, P. D. Experimental Design in Biotechnology, CRC Press, New York, 1989.

HAESBAERT, R.; LIMONAD, E. O território em tempos de globalização. **Etc., Espaço, Tempo e Crítica, Revista Eletrônica de Ciências Sociais Aplicadas e outras coisas**, p. 115, 2007.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARLEY, R. M. Introduction. In: STANNARD, BL (ed.) Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Royal Botanic Garden: Kew**, p.1-42. 1995.

HERRMANN, A.P.; WILLEMS, M.; JANKE, H. D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. **Water Research**, v. 35, p. 2575-2582, 2001.

HOTTA, H. et al. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1526, n. 2, p. 159-167, 2001.

- JAY, J. M. Microbiologia de alimentos Artmed. **Porto Alegre**, v. 711, 2005.
- JOHANN, S. et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 681-685, 2007.
- KAHKONEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.
- KLUYTMANS, J. A. J. W.; WERTHEIM, H. F. L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33, n. 1, p. 3-8, 2005.
- KOTHALE, K. V.; ROTHE, S. P.; PAWADE, P. N. Phytochemical screening of some Euphorbiaceae members. **Journal of Phytochemistry**, 2011.
- LENGAUER, T. and RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, 6(3):402-406, 1996.
- LIMA, I. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LOPES, D. et al. Essential oil from leaves of Croton sakaquinha BENTH. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 1, p. 48-49, 2003.
- LORDÊLO, C. S. M. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, 2010.
- LUND, R. D.; WEBSTER, K. E. Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei. An experimental anatomical study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 130, n. 4, p. 313-327, 1967.
- MACHADO, M. M. Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da Euphorbia tirucalli L. **Universidade Federal de Santa Maria– Centro de Ciências da Saúde**. São Paulo, 2007.
- MACIEL, M. A. M.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero Croton e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 2, n. 03, p. 54-73, 2013.
- MARAMBIO, O. G.; ACUÑA, P. F.; DEL CARMEN PIZARRO, G. **Métodos experimentales de química orgánica**. Ediciones Universidad Tecnológica Metropolitana, 2007.
- MARONPOT, R. R.; PETERSON, L. G. Spontaneous proteus nephritis among male C3H/HeJ mice. **Laboratory animal science**, v. 31, n. 6, p. 697-700, 1981.
- MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. **Biotechnology Advances**, v 26, p 548-560, 2008.
- MELECCHI, M. I. S. *Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus L.: estudo comparativo de métodos de extração*. 2005. 218f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

- MIGUEL, A.; ANDRADE, J. B. Rapid quantification of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.35, p.35-41, 1989.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5 ed. New York: John Wiley; Sons, 2001.
- MONTGOMERY, D. C.; MYERS, R. H. Response surface methodology. **Design and Analysis of Experiments**, p. 445-474, 1995.
- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2004.
- MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. São Paulo: Hemus, 1994.
- MORIMITSU, M.; OKAZAKI, A. A Novel Electrode Material for H₂O₂ Oxidation of Electrochemical Glucose Sensors. **ECS Transactions**, v. 19, n. 6, p. 211-218, 2009.
- MSHANA, N. R. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to the revision of ethnobotanical and floristic studies in Ghana. Organization of African Unity/Scientific, Technical and Research Commission (OAU/STRC). 2000.
- MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.
- NASCIMENTO, F. C. A.; BRASIL, D. S. B.; COSTA, R. A.; MARINHO, P. S. B.; TRINDADE, S. O. S. Análise Teórica de Dados Espectroscópicos de Dihidrochalconas Derivados do Produto Natural *Metrodorea stipularis*, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal do Pará.
- NASCIMENTO, L. D. Obtenção do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizando os métodos: hidrodestilação e destilação por microondas. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Química. Belém: UFPA, 2011.
- NAVARRO, D. **Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico**. Florianópolis, p. 37, 2005.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos, Bookman, Porto Alegre, RS, 2010.
- NÓBREGA, A. B. Padronização de extratos de *eugenia florida* DC. E seu estudo toxicológico para o desenvolvimento de um fitoterápico ou Fitofármaco. 2012.
- NYCHAS, G.J.E. Natural antimicrobials from plants. In: **GOULD, G.W. (Ed.). New methods of food preservation**. Londres: Blackie Academic; Professional, 1995. p. 59-87.
- O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 534-546, 2000.

- OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 34, n.11, p. 1471–1474, 2001.
- OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **New Microbiologica**, v. 29, n. 1, p. 49-54, 2006.
- OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16, p. 510-516, 2006.
- OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.381-384, 2007.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH-: estudo de revisão. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.
- PAIVA Jr, I.M.; SILVA, S.I.; ARAÚJO, E.L. Ocorrência e distribuição de Euphorbiaceae na Zona da Mata de Pernambuco. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 13, 2000, Pernambuco. **Anais...** Pernambuco: RNBOT, 2000. p. 114.
- PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, v. 15, n. 11-2, p. 11-2, 2004.
- PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* camb., Caryocaraceae.** 2004. ... f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- PETER, M. E; et al. Cell-surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1 -mediated apoptotic cell-death. **Ceil Death Differ**, v. 2, p. 163-171, 1995
- PISANO, M. B. et al. Antibacterial activity and molecular docking studies of a selected series of hydroxy-3-aryl coumarins. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2815, 2019.
- PITTATTE, Y.; BIGNON, J.; LAMBRE, C. R. Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. **G/ycobiology**, v. 3, p. 201-917, 1993.
- QIU, X. et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. **Protein Science**, v. 10, n. 10, p. 2008-2016, 2001.
- RAJESH, R. et al. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, n. 10, p. 1313-1322, 2006.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2001.

- RAUHA, J. P. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, n.1., p.3-12, 2000.
- REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. 15 Antioxidants. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**, p. 409, 2008.
- RIBEIRO, L. G. M.; ALVES, L. H. D.; SILVA, M. B. Melhoria da qualidade na produção de peças de grande porte em aço fundido utilizando planejamento de experimentos. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, v. 4, n. 1, p. 36-41, 2013.
- RICARDO, L. M. et al. **O uso de plantas medicinais na medicina popular praticada em assentamentos do MST do estado do Rio de Janeiro: uma contribuição para o SUS**. 2011. Tese de Doutorado.
- ROCHA, F. F. et al. Avaliação dos efeitos antinociceptivo e antiinflamatório de *Croton pullei* var. *glabrior* LANJ. (Euphorbiaceae). **Rev. bras. farmacogn.** [online]. 2008, vol.18, n.3, p.344-349.
- ROCHA, L. G. R. et al. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Rev Bra Farmacogn**, v. 19 p. 51-56, 2009.
- RODRIGUES, C. C. **Estudo de métodos de extração, quantificação de compostos fenólicos, avaliação de atividades antioxidante e antimicrobiana da casca do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2017.
- RODRIGUES, M. I.; A. F. IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos E Otimização de Dissertação de Planejamentos, Casa Do Pão Editora, Campinas, São Paulo, 2005.
- RODRIGUES, M. R. A. **Estudos dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. Tese de doutorado em Química. Porto Alegre: UFRGS, 2002.
- RODRIGUEZ, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 ed. Campinas, SP, 2009.
- ROGINSKY, Vitaly; LISSI, Eduardo A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.
- RON, B.H.; WILLS, K.B.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. **Nutrition Research Reviews**, v. 36, p. 65-71, 2000.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.
- SANDOVAL, Miguel et al. Evaluación de la toxicidad hepática y renal aguda y subaguda del látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado) en animales de experimentación. In: **Anales de la Facultad de Medicina**. UNMSM. Facultad de Medicina, 2005. p. 119-126.
- SANTOS, E. R. M. S. **Extração, caracterização e avaliação bioativa do extrato de *Rumex acetosa***. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- SANTOS-FILHO, F. S.; SALES, M. F.; LUCENA, M. F. A. Levantamento preliminar da família Euphorbiaceae Juss. do Parque Estadual Zoobotânico na cidade de Teresina,

Piauí, Brasil. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 13, 2000, Pernambuco **Anais...** Pernambuco: RNBOT, 2000. p. 90.

SCHAECHTER, M. et al. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 2002.

SCHAUER, R. Sialic acids and their role as biological masks. **Trends Biochem Sci**, v. 10, p. 357-360, 1985.

SCHIMMEL, P.; TAO, J.; HILL, J. Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives. **FASEB J**. v. 12, p.1599–1609, 1998.

SCHWEITZER, B. I.; DICKER, A. P.; BERTINO, J. R. Dihydrofolate Reductase as a Therapeutic Target. **FASEB J**, v. 4, p. 2441- 2452, 1990.

SCOPEL, M. **Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. ; Schlttdl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade.** 2005. 227 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre. 2005.

SECCO, R. S. Bol. Museu Paraense Emílio Goeldi, *Ser. Bot.* v. 8, p. 265. 1992.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; SANTOS, E. V. M.; LUCIO, E. M. R. A.; **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**, Santafé de Bogotá, D.C., Colômbia, 2000.

SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.

SILVA, A. A. S. et al. ANTI-LEISHMANIAL AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF THE ETHANOL EXTRACT OF *Croton argyrophylloides* MUELL. ARG. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 3, p. 165-171, 2016.

SILVA, B. A. et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food chemistry**, v. 90, n. 1, p. 157-167, 2005.

SILVA, B. L. R. Ecofisiologia e morfoanatomia de herbáceas em florestas secas em regeneração. **Tese de Doutorado**, UFPE – Pernambuco. 2016.

SILVA, N. M. M. **Estudo de quantificação dos compostos fenólicos, avaliação das atividades antioxidante da casca do caule de *Croton pullei* LANJ.** 2019. 56 pgs. Trabalho de Conclusão de Curso. Belém. Universidade Federal do Pará, 2019.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 6ª ed., Ed.Universidade/UFRSC/ED. UFSC, Porto Alegre, 2007.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004.

- SOBRAL, M. B. P. **Flora arborescente do Rio Grande do Sul, Brail**. Porto Alegre: Editora RIMA e Novo Ambiente. 2006.
- SONG, W.; WOO, H.J.; KIM, J.S.; LEE, K.M. In vitro activity of blactams in combination with other antimicrobial agents against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.8-12, 2003.
- SOTRIFFER, C.; FLADER, W.; WINGER, R., RODE, B., LIEDL, K., and VARGA, J. Automated docking of ligands to antibodies: Methods and applications. **Methods**, 20(3):280–291, 2000.
- SOUSA, C. M de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, F. S. et al. Dados Espectroscópicos de Diterpenos Labdânicos: Uma Análise Teórica via RMN e DFT. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 645-650, 2015.
- SOUZA, M. A. et al. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 705-716, 2005.
- SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringes* (Mart.) Coville (Leguminosae-mimosaidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007.
- SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringes* (Mart.) Coville (Leguminosae-mimosaidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007.
- SPECK, T; ROEW, N. P. BRUCHERT, F; HABERER, W; GALLENMULLER, F; SPATZ, H. How plants adjust the material properties of their stems according to differing mechanical constraints during growth an example of smart design in nature. **In Bioengineering**, v. 5, p. 233-241.,1996.
- STAHL, M. L.; WILLIAMS, F. D. Immunofluorescent evidence of *Proteus mirabilis* swarm cell formation on sterilized rat feces. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 3, p. 801-806, 1981.
- STERNBERG, S. The Emerging Fungal Threat. **Science**, v. 266, p. 1632-1634, 1994.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.
- SUJATHA K.; KALLURAYA, B.; JOSHI, S. D. SYNTHETIC STUDIES ON 3-ARYLOXYETHYL-4-ARYLIDENE AMINO-5-MERCAPTO-1,2,4-TRIAZOLES AND BIOLOGICAL EVALUATION AS ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL AGENTS. **KASAYAN J. Chem**, v. 12, n. 3, p. 1405-1417, 2019.
- SWADDIWUDHIPONG, W.; TANGKITCHOT, T.; SILARUG, N. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* postoperative endophthalmitis caused by contaminated intraocular irrigating solution. **Transr Soc Trop Med Hyg**, v.89, n.3, p.288-89, 1995.
- TAHARA, S. Planejamento de experimentos (doe). Dezembro 2008. Disponível em: <http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Experimentos-DOE#eztoc113642> 1 13. Acesso em fevereiro de 2020.

TAVARES, N. U. L.; BERTOLDI, A. D.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. Prescrição de antimicrobianos em unidades de saúde da família no Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 1791-1800, 2008.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. São Paulo: Atheneu, p. 615, 2006.

TAYLOR, G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. **Current opinion in structural biology**, v. 6, n. 6, p. 830-837, 1996.

THOMSEN R.; CHRISTENSEN, M. H. **MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking**. Journal of Medicinal Chemistry, v. 49, n.11, 2006.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TORRES, M. C. M. et al. Composição química dos óleos essenciais de *Croton sonderianus* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81493-81503, 2020.

TRABULSI, E. J.; GUILLONNEAU, B. Laparoscopic radical prostatectomy. **The Journal of urology**, v. 173, n. 4, p. 1072-1079, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TREASE, G. E.; EVANS, W. C. Pharmacognosy. 14.ed. London: W. B. Saunders, p. 120, 1996.

TRINDADE, S.O.S. Método teoria do funcional aplicado à predição de dados de IV e de RMN dos alcalóides crotonimidás A e B: produtos naturais derivados de *Croton pullei*. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em ciências (Licenciatura em Química) – Universidade Federal do Pará, 2010.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

VARKI, A. Diversity in the sialic acids. **Glycobiology**, v. 2, p. 25-40, 1992.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 52, p. 609-613, 2003.

VUPPALA, S. et al. Structure-based lead optimization to improve the antifungal potency of the tetrahydroimidazo pyridine inhibitors targeted to *Candida albicans* dihydrofolate reductase and lanosterol 14- α -demethylase. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 10, p. 1674-1682, 2019.

WANG, Z.; GERSTEIN, M. & SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, p.57–63, 2009.

WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiol**, v. 20, p. 305-311, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Global strategy for containment of antimicrobial resistance**. Geneva: WHO, 2001.

XIAO, Z. P.; MA, T. W.; LIAO, M. L.; FENG, Y. T.; PENG, X. C.; LI, J. L.; LI, Z. P.; WU, Y.; LUO, Q.; DENG, Y. et al., Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents: Synthesis, molecular docking and structure–activity relationship analysis of 3-aryl-4-arylamino-furan-2(5H)-ones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, p. 4904–4914.

ZHENG, W. et al. Structure-based identification of a potent inhibitor targeting Stp1-mediated virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. **Cell chemical biology**, v. 23, n. 8, p. 1002-1013, 2016.

9 APÊNDICE

9.1 Laudo de identificação botânica

LABORATÓRIO DE BOTÂNICA-HERBÁRIO

LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

1) DADOS DO SOLICITANTE:

Pessoa Física ou Jurídica: NAYARA MARIA MONTEIRO DA SILVA			
CPF ou CNPJ:		C.I. ou Inscrição Estadual	
Endereço:			
Bairro:	CEP:	Cidade: Belém	UF: PA
Telefone: 99613307	FAX:	E-mail: nayengquimica8@gmail.com	

2) DADOS DO MATERIAL PARA ANÁLISE:

Local de Origem: Peixe-boi		Quantidade de Amostras: 01	
Tipo de Amostra: () Fértil (X) Estéril			
Nome do Coletor: Alexandre Moraes			
Data de Entrada no Laboratório: 20.09.2019		Analisado por: Manoel e Ednaldo Nascimento	
Destino e/ou Utilização do Laudo: Dissertação mestrado		Supervisionado por: Silvane Tavares	

Processo utilizado para Identificação:

Comparação com exsiccatas do acervo do herbário IAN.

Classificação dos gêneros em família segundo APG III.

Lista de espécie da Flora do Brasil.

RESULTADO DAS ANÁLISES

Cod.	Nome Comum	Nome Científico	Família
01		<i>Croton pullei</i> LANJ.	Euphorbiaceae

Obs: Prazo de permanência do material no laboratório: 60 dias; a partir dessa data, o material ficará a critério do laboratório.

Laudo digitado em: 12.10.2019

Supervisionado em:

Recebido em: 20.11.2019